

Die zelluläre Lokalisation der SPHK1a in Abhängigkeit vom Gefäßgebiet

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Müller, Cindy

aus Fulda

Gießen 2008

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Direktorin: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. med. Hans Hölschermann

Tag der Disputation: 04. Dezember 2008

1. Einleitung	1
Sphingolipide	2
Sphingolipid-Metabolismus.....	3
Funktionen des Sphingosin-1-Phosphat.....	4
Intrazelluläre Wirkungen als second messenger.....	5
Extrazelluläre Funktionen von S1P.....	6
Sphingosinkinase.....	8
Das Blutgefäßsystem	10
Allgemeiner Wandaufbau der Blutgefäße.....	10
Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
Material	15
Reagenzien und Lösungen.....	15
Geräte.....	16
Antiseren/-körper.....	16
Filter bei der Fluoreszenzmikroskopie.....	17
Methoden	18
Gewebeaufbereitung.....	18
Gewebebegewinnung.....	18
Aufbereitung der Lungenpräparate.....	18
Entnommene Gewebe.....	19
Immunhistochemie	21
Einfache Immunfluoreszenz.....	21
Indirekte Immunfluoreszenz.....	21
Direkte Immunfluoreszenz.....	22
Doppelimmunfluoreszenz.....	22
Spezifitätskontrolle	23
Präabsorption.....	23
Negativ-Kontrolle.....	24
Fluoreszenzmikroskopie	24
Allgemeine Informationen zum Ablauf der immunhistochemischen Untersuchungen ...	25

3. Ergebnisse	27
Präabsorption	27
Blutgefäß- und Kreislaufsystem	31
Gefäße des Körperkreislaufs.....	31
Herz.....	39
Unterer Respirationstrakt	48
Trachea.....	48
Lunge.....	51
Gastrointestinaltrakt	55
Zunge.....	55
Ösophagus.....	59
Duodenum, Jejunum.....	61
Leber.....	64
Pankreas.....	67
Nervensystem	70
Gehirn.....	70
Spinalganglien.....	75
N. ischiadicus.....	77
Urogenitaltrakt	79
Niere.....	79
Uterus.....	87
Nebenniere	94
Bewegungsapparat	97
M. biceps brachii.....	97
Zusammenfassung der Ergebnisse	101

4. Diskussion	102
Methoden	102
Herz-Kreislauf-System	103
Blutgefäße.....	103
Herz.....	105
Unterer Respirationstrakt	108
Gastrointestinaltrakt	109
Intestinum.....	109
Zunge.....	111
Leber, Pankreas.....	112
Nervensystem	113
Gehirn.....	113
Spinalganglien, N. ischiadicus.....	115
Urogenitaltrakt	116
Niere.....	116
Uterus.....	117
Nebenniere	118
Bewegungsapparat	119
M. biceps brachii	119
 5. Zusammenfassung	 121
 6. Literaturverzeichnis	 124
 7. Erklärung	 142
 8. Lebenslauf	 143
 9. Danksagung	 144

1. Einleitung

Die Sphingosinkinase (SPHK) ist ein wichtiges Enzym im Sphingolipid-Metabolismus der Zelle (Olivera et al., 2001). Sie katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und hat somit Einfluss auf die intrazelluläre Menge von S1P und Sphingosin (Liu et al., 2002). Das Sphingolipid-Gleichgewicht wird zu einem Anteil auch von den S1P-Phosphatasen, die S1P zu Sphingosin umwandeln, und den S1P-Lyasen, die für den irreversiblen Abbau des S1P zu Phosphoethanolamin und Hexadecenal verantwortlich sind, beeinflusst (Hannun et al., 2001). Das Gleichgewicht ist aufgrund der gegensätzlichen Wirkungen der beiden Metabolite S1P und Sphingosin entscheidend für Prozesse wie Proliferation und Apoptose der Zelle (Spiegel et al., 2003). Darüber hinaus gibt es noch weitere wichtige Prozesse wie Inflammation (Cinque et al., 2003), Migration (Rosenfeldt et al. 2001), Vaskulogenese (Liu et al., 2000), Angiogenese (Wang et al., 1999; English et al., 2002), Gefäßpermeabilität (Garcia et al., 2001) und -kontraktion (Xu et al., 2004), in die S1P entweder als intrazellulärer Botenstoff (second messenger) oder als extrazellulärer Ligand eingreifen kann (Van Brocklyn et al., 1998). Da die S1P-Menge vor allem von der SPKH geregelt wird, hat dieses Enzym eine essenzielle Funktion in der Regulation dieser Stoffwechselmechanismen. (Liu et al., 2002). Durch Dysregulation des S1P-Metabolismus kann es zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen kommen, wie Arteriosklerose (Siess et al., 2000), Autoimmunerkrankungen (Fujino et al., 2003; Yang et al., 2003), Asthma bronchiale (Jolly et al., 2001), Apoplex cerebri (Lenzi et al., 1994), Myokardinfarkt (Cavallini et al., 1999; Siess, 2002), arterielle Hypertonie (Johns et al., 2000; Johns et al., 2001; Karlinger, 2002) und Tumorerkrankungen (Ogretmen et al., 2004). Daher ist es unentbehrlich, die grundlegenden Zusammenhänge des Sphingolipid-Metabolismus zu erforschen und zu verstehen, um neue effektive therapeutische Ansätze entwickeln zu können (Kester et al., 2003; Radin, 2003).

Sphingolipide

Die Sphingolipide wurden 1884 von Johann L. W. Thudicum entdeckt. Da dem Arzt und Chemiker die biologische Funktion dieser Substanzgruppe rätselhaft erschien, benannte er sie nach der griechischen mythologischen Figur der Sphinx (Spiegel et al., 2003). Auch heute noch, über 100 Jahre später, sind nicht alle Geheimnisse der Sphingolipide gelüftet und die verschiedenen Funktionen sind nur zum Teil erforscht und bekannt.

Die Sphingolipide sind neben den Glycerophospholipiden und den Steroiden ein ubiquitärer Bestandteil von Membrandoppelschichten. Die drei Typen von Membranlipiden besitzen sowohl polare als auch unpolare Bereiche und sind damit hydrophob und hydrophil zugleich.

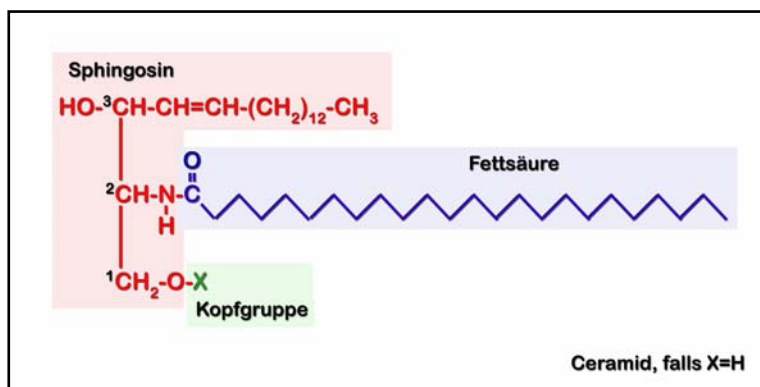


Abb. 1: Allgemeine Strukturformel für Sphingolipide (modifiziert nach Voet et al., 1994)

Sie werden als amphiphil oder synonym als amphipatisch bezeichnet. Die Sphingolipide bestehen vornehmlich bei Säugetierzellen aus einem Molekül des langkettigen (C_{18}) Aminoalkohols Sphingosin (4-Sphingenin) oder einer der C_{16} -, C_{17} -, C_{19} - oder C_{20} -Homologen,

sowie einem Molekül einer langkettigen Fettsäure und einer polaren Kopfgruppe (Abb. 1). Die polare Kopfgruppe kann auch gelegentlich mit einer Phosphorsäure über eine Diesterbindung verknüpft sein. Ist die Fettsäure über eine Amidbindung mit der $-NH_2$ -Gruppe verknüpft, handelt es sich um ein Ceramid, die gemeinsame Grundstruktureinheit aller Sphingolipide. Ceramide kommen nur in geringen Mengen in pflanzlichen und tierischen Geweben vor, bilden aber die Ausgangssubstanz für häufiger vorkommende Sphingolipide: von Cerebrosiden als Bestandteil neuronaler Plasmamembranen, von Gangliosiden als komplexe Membranlipide der grauen Substanz des Gehirns und von Sphingomyelinen, die Komponenten von tierischen Zellmembranen und Myelinscheiden sind. Cerebroside und Ganglioside enthalten eine oder mehrere Zuckereinheiten in der Kopfgruppe, aber kein Phosphat, und werden als Glycosphingolipide klassifiziert. Sphingomyeline haben als polare Kopfgruppe Phosphocholin oder Phosphoethanolamin und werden daher wie die Glycerophospholipide zu den Phospholipiden gezählt (Voet et al., 1994; Stryer, 1996).

Sphingolipid-Metabolismus

Im Mittelpunkt des Sphingolipidmetabolismus steht Ceramid, das durch verschiedene Synthese- oder Abbauvorgänge gebildet werden kann: De-novo-Synthese, Hydrolyse von Sphingomyelin durch Sphingomyelinase (SMase) oder von Cerebroside durch Cerebrosidase (CRS) im Golgi-Apparat der Zelle (Ogretmen et al., 2004). Den größten Anteil an der Ceramid-Synthese hat die Degradation von Sphingomyelin aus den Zellmembranen

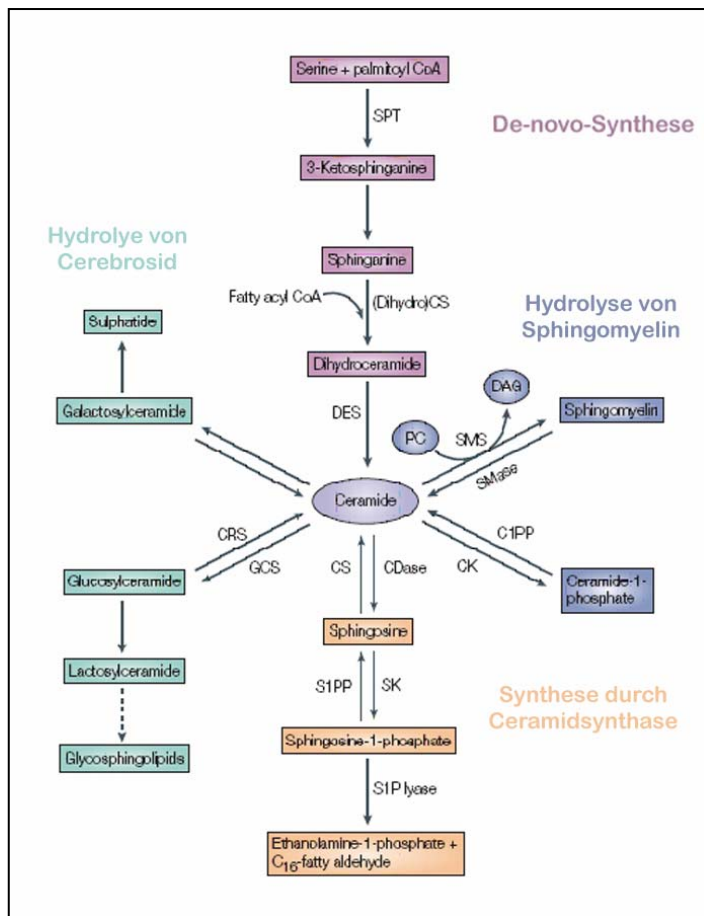


Abb. 2: Sphingolipid-Metabolismus (aus Ogretmen et al., Nature, 4: 604-616; 2004)

(Kolesnick et al., 1998). Umgekehrt bildet Ceramid die Vorstufe für die Synthese von Sphingomyelin und Glycolipiden oder wird durch die Ceramidkinase (CK) zu Ceramid-1-Phosphat phosphoryliert (Sugiura et al., 2002). Ceramid kann auch durch die Ceramidase (CDase) in Sphingosin umgewandelt und weiter durch die SPHK (SK) zu S1P phosphoryliert werden. S1P-Lyase und S1P-Phosphatase (S1PP) bauen S1P zu Ethanolamin-1-Phosphat und Hexadecanal bzw. zu Sphingosin ab (Mandala et al., 2000; Le Stunff et al., 2002b). Sphingosin kann durch die Ceramidsynthase (CS) zu Ceramid metabolisiert werden (Spiegel et al., 2003). Die De-Novo-Synthese beginnt

an der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit der Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphinganine (Synonym: 3-Dehydrosphinganine) durch die Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) (Merrill, 2003). Anschließend wird 3-Ketosphinganine durch die 3-Ketosphinganine-Reduktase zu Sphinganine (Synonym: Dihydrosphingosin) reduziert (Pettus et al., 2002). Die CS katalysiert die Übertragung einer Acylgruppe auf die Aminogruppe von Sphinganine unter Bildung einer Amidbindung zu Dihydroceramid (Mathias et al., 1998). Dihydroceramid wird durch die Desaturase (DES) in einer Oxidationsreaktion zu Ceramid (Synonym: N-Acylsphingosin) metabolisiert (Michel et al., 1997).

Funktionen des Sphingosin-1-Phosphat

Den Sphingolipiden wurde nach ihrer Entdeckung vornehmlich eine strukturelle Rolle als Bestandteil von Lipiddoppelschichten in Zellmembranen zugeordnet (Spiegel et al., 2003). Erst Anfang der 90er Jahre wurde die zentrale Bedeutung einiger Sphingolipid-Metabolite in wichtigen Regulationsmechanismen der Zelle, wie Proliferation (Zhang et al., 1991) erkannt. Dabei agieren die verschiedenen Sphingolipide, u. a. Ceramid, Sphingosin und S1P, nicht nur als inaktive Vorstufen oder Zwischenprodukte des Sphingolipid-Metabolismus, sondern beeinflussen auch aktiv bestimmte essenzielle Signaltransduktionswege (Zanolari et al., 2000; Futerman et al., 2004). Durch die zum Teil gegensätzlichen Wirkungen der beiden Metabolite Sphingosin und S1P ist das Gleichgewicht zwischen diesen Sphingolipiden entscheidend für den weiteren Signaltransduktionsweg (Le Stunff et al., 2004a). S1P ist in der Lage, sowohl extrazellulär als Ligand für spezielle G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als auch intrazellulär als second messenger zu wirken (Van Brooklyn et al., 1998; Zhang et al., 1999; Spiegel et al., 2000).

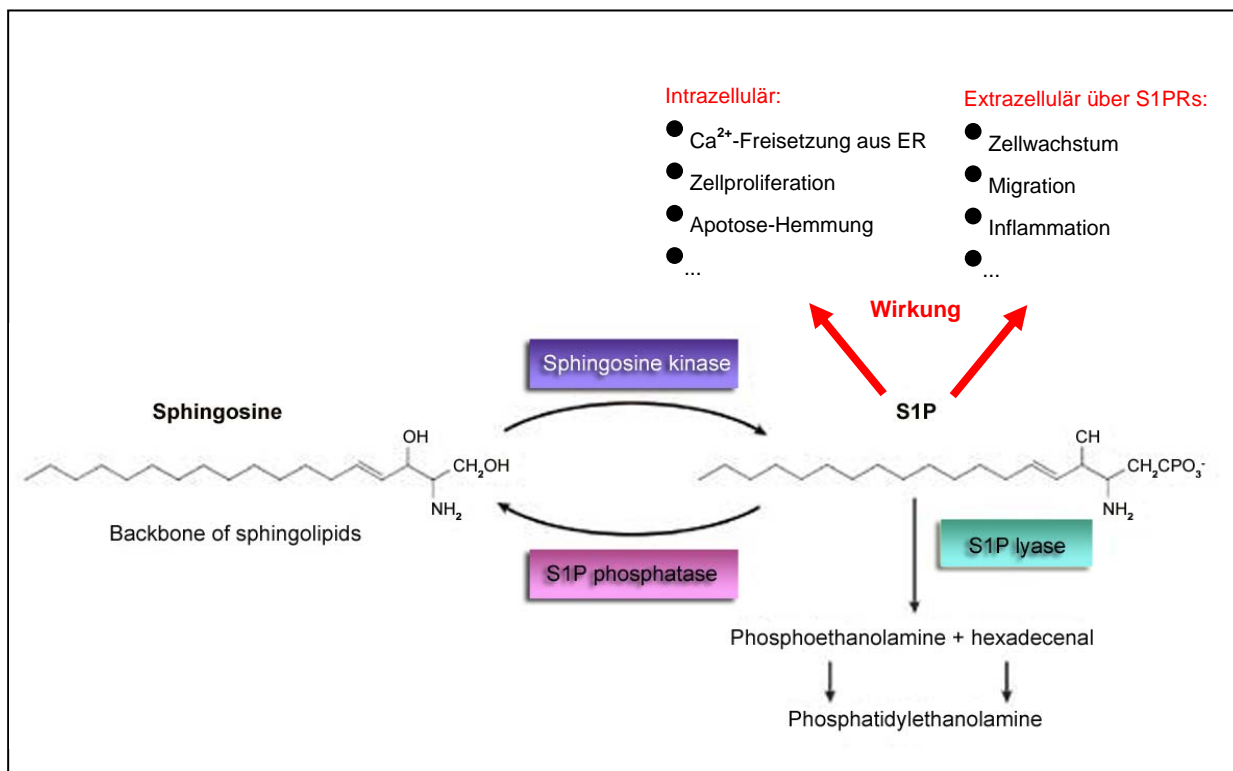


Abb. 3: Sphingolipid-Gleichgewicht (modifiziert nach Spiegel et al., Nature, 4: 397-407, 2003)

Intrazelluläre Wirkungen als second messenger

Die S1P-Konzentration wird intrazellulär durch eine räumliche und zeitliche Regulation der Synthese und des Abbaus im Gleichgewicht gehalten (Le Stunff et al., 2004b). S1P bewirkt in der Zelle eine Wachstumssteigerung (Olivera et al. 1993) und Suppression der Apoptose (Edsall et al., 2001; Xia et al., 2002), während die metabolischen Vorstufen, Ceramid und Sphingosin, zu Wachstumsarrest und Apoptose führen (Cuvillier et al., 1996; Kolesnick et al., 1998). Da S1P und Ceramid direkt ineinander umwandelbar sind (Abb. 3) und so in einem Gleichgewicht zu einander stehen, ist es nicht die absolute Menge der Metaboliten, sondern vielmehr ihre relative Konzentration, die über Proliferation oder Apoptose der Zelle entscheidet (Spiegel et al., 2002). Die Enzyme S1P-Phosphatase (Van Veldhoven et Mannaerts, 1994), die S1P zu Sphingosin umwandelt, und insbesondere die SPHK (Yatomi et al., 1995), die Sphingosin zu S1P phosphoryliert, regulieren dieses Sphingolipid-Gleichgewicht und sind somit zentrale Regulatoren der zum Teil antagonistischen/konträren Prozesse, in die diese Sphingolipide eingreifen (Le Stunff et al., 2002a).

Ein weiterer essenzieller biologischer Prozess, der von dem Sphingolipid-Gleichgewicht beeinflusst wird, ist die Calcium-Homöostase der Zelle (Young et al., 2002). S1P kann Calcium aus den intrazellulären Speichern über einen 1,4,5-Inositol-Trisphosphat (InsP_3)-unabhängigen Weg freisetzen (Gosh et al., 1990; Mattie et al., 1994), während Sphingosin die store-operated Ca^{2+} release-activated calcium current (I_{crac}), die zur Auffüllung der Ca^{2+} -Speicher dienen, blockiert (Mathes et al., 1998). Die genauen Mechanismen der Ca^{2+} -Freisetzung - vielleicht auch des Ca^{2+} -Einstroms (Itagaki et al., 2003) - in die Zelle und der daran beteiligten Stoffe sind noch nicht bekannt. Auch konnte in den letzten Jahren bei immer mehr äußeren Stimuli, die ohne Aktivierung der Phospholipase C (PLC) die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration regulieren, nachgewiesen werden, dass sie die SPHK aktivieren: Fc ϵ RI-Antigen-Rezeptor (Choi et al., 1996), epidermal growth factor (EGF)-Rezeptor (Meyer zu Heringdorf et al., 1999), muskarinische Acetylcholin (mACh)-Rezeptoren (van Koppen et al., 2001), S1P-Rezeptoren (Meyer zu Heringdorf et al., 2001), platelet-derived-growth-factor (PDGF)-Rezeptor und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Meyer zu Heringdorf et al., 1998). Diese intrazellulären Signaltransduktionswege des S1P unterscheiden sich von den Mechanismen, die durch Aktivierung der S1P-Rezeptoren durch extrazelluläres S1P induziert werden, da die Rezeptoren über die Stimulierung der PLC eine Ca^{2+} -Freisetzung bewirken (Meacci et al., 2002).

Das Sphingolipid-Gleichgewicht ist ein wichtiger Bestandteil in der inflammatorischen Zellantwort, denn Sphingosin inhibiert die Leukotriensynthese und Zytokinproduktion und S1P fördert die Sekretion von verschiedenen Zytokinen in durch Antigenkontakt aktivierten Mastzellen (Prieschl et al., 1999). Auch die Mastzell-Degranulation durch Aktivierung der FcεRI-Rezeptoren durch IgE/Antigen-Kontakt wird über die Phospholipase D1 (PLD) oder SPHK1 gesteuert (Melendez et al., 2002). Die SPHK1 ist auch beteiligt an durch TNFα vermittelten inflammatorischen Immunantworten und der resultierenden Cyclooxygenase-2(COX2)- und Prostaglandin E2(PGE2)-Produktion (Xia et al., 2002; Pettus et al., 2003).

Extrazelluläre Funktionen von S1P

S1P ist mit einer Konzentration von 0,2-0,5 µM ein normaler Bestandteil des Blutplasmas (Yatomi et al., 1997a). Im Serum liegt die Konzentration weit höher (1-5 µM), da hämatopoetische Zellen, vor allem Thrombozyten (Yatomi et al., 1995; Igarashi et al., 1998), Monozyten und Mastzellen, im aktivierten Zustand S1P sezernieren (Yang et al., 1999). Der genaue Sekretionsmechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Extrazelluläres S1P ist Ligand für den endothelial differentiation gene-1(EDG-1)-Rezeptor (Lee et al. 1998) und für weitere vier G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus dieser Familie: EDG-5, -3, -6 und -8 (Van Koppen et al., 1996; Anliker et al., 2004). Aufgrund der hohen Affinität und Spezifität dieser fünf Rezeptoren für ihren Liganden wurden sie in S1P-Rezeptoren₁₋₅ (S1P₁₋₅) umbenannt (Chun et al., 2002).

S1P-Rezeptoren sind in den meisten Geweben der Säugetiere zu finden, jedoch ist die genaue Expression der Membranproteine auch von der Spezies, dem Alter und dem Zelltyp abhängig (Karliner, 2002; Hla, 2003). S1P₁-Rezeptoren werden weit verbreitet von vielen Zellarten exprimiert (Takuwa et al., 2001). Erstmals wurde der Prototyp der Sphingolipid-Rezeptoren in Endothelzellen der V. umbilicalis isoliert (Hla et al., 1990). Der S1P₃-Rezeptor kommt hauptsächlich in Herz, Lunge, Niere und Gehirn vor, während S1P₂-Rezeptoren neben Herz und Lunge nur in geringen Mengen im adulten Gehirn von Ratten und Mäusen nachgewiesen wurden. Die S1P₄-Rezeptoren sind vornehmlich in Lunge, lymphoiden und hämatopoetischen Geweben lokalisiert (Graler et al., 1998). In der weißen Substanz des Gehirns und der Milz sind vermehrt S1P₅-Rezeptoren zu finden (Im et al., 2000).

S1P₁₋₅ können an viele G-Proteine in der Zelle koppeln und damit sehr unterschiedliche Signaltransduktionswege in verschiedenen Geweben bzw. in einer Zelle stimulieren oder auch inhibieren (Pyne et al., 2000; Shirao et al., 2002). Einen kleinen Einblick in die Komplexität

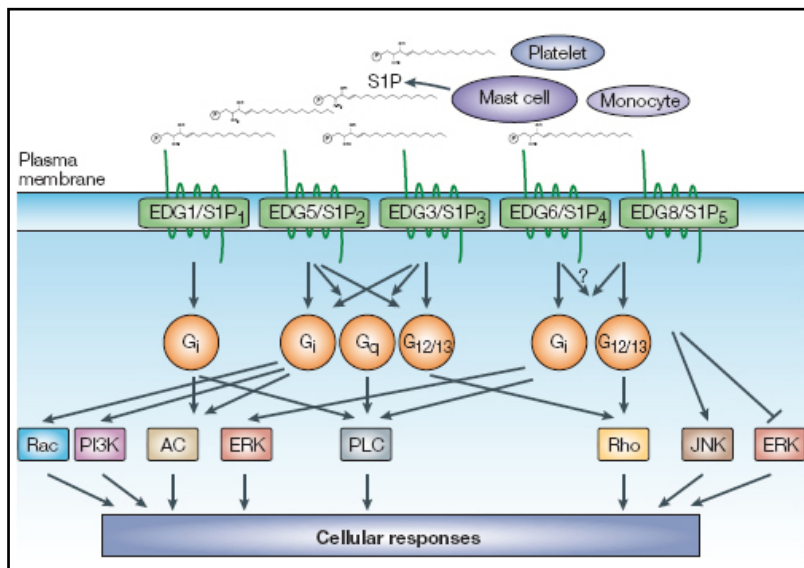


Abb. 4: Verschiedene Signaltransduktionswege der S1P-Rezeptoren (aus Spiegel et al., Nature, 4: 397-407, 2003)

der Signaltransduktionswege der S1P-Rezeptoren soll Abb. 4 geben. Neben den intrazellulär präsenten G-Proteinen beeinflussen auch die relative Expression der fünf Rezeptoren in der Zellmembran und die Zellart die resultierende Zellantwort (Payne et al., 2002). Durch diese vielen beteiligten Faktoren können durch S1P verschiedene

Reaktionen eines funktionellen Systems ausgelöst werden (Goetzl et al., 1998), z.B. reagieren die glatten Gefäßmuskelzellen auf S1P-Applikation in Abhängigkeit von Konzentration und Lokalisation mit Kontraktion, Relaxion oder aber sie zeigen keine Reaktion (Nofer et al., 2004; Watterson et al., 2005). Neben dem Gefäßmuskeltonus werden noch weitere sehr unterschiedliche Prozesse durch S1P bzw. S1P-Rezeptoren gesteuert, wie z. B. Angiogenese (Hla et al., 2001; Allende et al., 2002; Saba et al., 2004), Gefäßpermeabilität (Lee et al., 1999; Sanchez et al., 2003), Herzentwicklung (Kupperman et al., 2000; Ishii et al., 2001), Zytoskelettveränderungen (Garcia et al., 2001), Ca²⁺-Homöostase (Okamoto et al., 1998), Neurogenese (MacLennan et al., 1997; McGiffert et al., 2002), Migration (Mandala et al., 2002), Zellproliferation (Zhang et al., 1990) und Chemotaxis (Morales-Ruiz et al., 2001; Sugimoto et al., 2003; Le Stunff et al., 2004a).

Sphingosinkinase

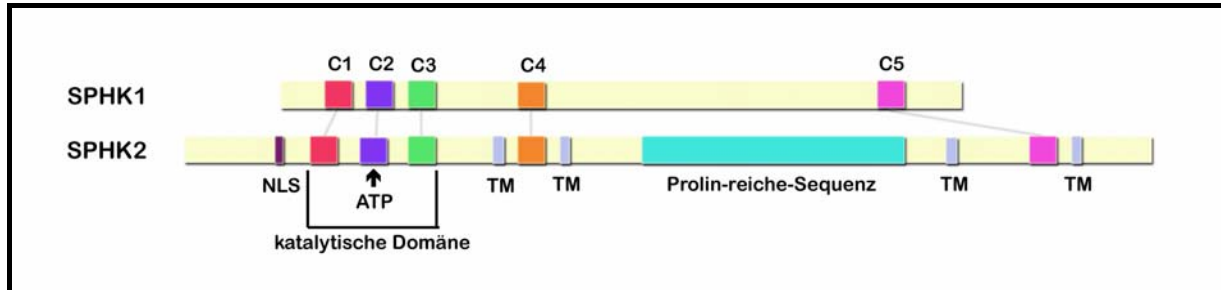


Abb. 5: Isoformen der SPHK 1 und 2

Die SPHK ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym in Säugetierzellen. Es benötigt ATP für die Phosphorylierung der Hydroxylgruppe am C₁-Atom des Sphingosins zu S1P. Die erste Säugetier-SPHK wurde 1998 aus Rattennieren isoliert und geklont (Olivera et al., 1998). Die beiden geklonten SPHK-Isoformen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Lcb4 und Lcb5, zeigen neben einer großen Proteinsequenz-Homologie zu der SPHK der Säugetiere (Nagiec et al., 1998) auch äquivalente Funktionen, wie Regulation der Proliferation (Olivera et al., 1999; Jenkins et al., 2001) und Calcium-Homöostase (Gosh et al., 1994; Birchwood et al., 2001). Durch Datenbankrecherchen wurden auch in weiteren Organismen wie Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, Nishiura et al., 2000), Fliegen (*Drosophila melanogaster*, Adachi-Yamada et al., 1999) und Würmern (*Caenorhabditis elegans*, Saba et al., 2004) Homologe der SPHK gefunden. Die starke Ähnlichkeit der Proteinsequenz in den verschiedenen Organismen weist auf eine durch die Evolution kaum veränderte Lipidkinasen-Familie hin (Hannun et al., 2001). Alle SPHKs weisen fünf hoch-konservierte Domänen (C1-C5) mit einer einheitlichen katalytischen Domäne in C1-C3 auf (Abb. 5). Auf der Basis dieser Homologie wurde eine SPHK-Isoform bei Mäusen und Menschen identifiziert und geklont (Liu et al., 2000). Die beiden Isoformen weisen die für die Lipidkinasen charakteristischen Domänen C1-C5 mit der ATP-Bindungsstelle (SGDGX(17-21)K(R)) in der Domäne C2 auf. Die Domänen C1-C3 zeigen eine große Ähnlichkeit mit der ATP-Bindungsstelle der katalytischen, Glycin-reichen Domäne der Diacylglycerolkinase, und bei spezifischer Mutation des Glycin 82 zu Aspartat in der C2 Domäne resultiert eine inaktive SPHK-Mutante (Pitson et al., 2002). Aufgrund dieser Beobachtung wird den Domänen C1-C3 die katalytische Funktion des Enzyms zugeordnet. Trotz der großen Homologie der beiden Isoformen gibt es Unterschiede in der Proteinsequenz. Die SPHK2 mit 65 kDa ist bedeutend größer als die Isoform 1 mit 49 kDa

und weist außerhalb der stabilen Domänen C1-C5 variable Proteinsequenzen auf: eine am NH₂-terminalen Ende und eine im Zentrum des Proteins (Kohama et al., 1998). Die funktionelle NLS-Region (nuclear localization signal) am Amino-Ende der SPHK2 beinhaltet eine Arginin-reichen Sequenz (RGRRGGRRR) und schleust das Enzym in das Nukleoplasma ganz bestimmter Zellreihen ein (Igarashii et al., 2003). Die Prolin-reiche Region in der Proteinmitte interagiert mit dem Interleukin-12-Rezeptor und beeinflusst so den Interleukin-12 Signalweg (Yoshimoto et al., 2003). Die Aminosäuresequenz der SPHK1 weist keine hydrophoben Transmembranregionen (TM) auf, wohingegen bei der SPHK2 vier Transmembranregionen identifiziert wurden (Spiegel et al., 2003). Die Kinasen sind vornehmlich im Zytosol der Zelle lokalisiert, die SPHK2 ist zudem noch in der Plasmamembran und im Zellkern nachweisbar (Igarashii et al., 2003). Auch die Gewebeverteilung der Enzyme zeigt Unterschiede: SPHK1 ist vornehmlich in Lunge, Milz und Leber vorhanden, während die SPHK2 vor allem in Gehirn, Herz und Leber nachweisbar ist (Le Stunff et al., 2004a). Weiterhin erfüllen die Isoformen unterschiedliche zelluläre Funktionen (Shu et al., 2002; Liu et al., 2003a) und ihre Regulation erfolgt wahrscheinlich auch auf verschiedene Art und Weise, da sie neben unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und enzymatischen Eigenschaften auch phylogenetisch eine differente Gewebeverteilung und zeitliche Expression besitzen (Gijssbers et al., 2001; Olivera et al., 2001).

Verschiedene Untersuchungen ergaben Hinweise auf weitere Isoformen der SPHK (Banno et al., 1998; Fukuda et al., 2003), die noch nicht näher identifiziert werden konnten. Es konnten jedoch Splice-Varianten der SPHK1, SPHK1a und SPHK1b in verschiedenen Spezies beschrieben werden, die sich nur durch wenige Aminosäuren am NH₂-terminalen Proteinende unterscheiden (Kohama et al., 1998; Murate et al., 2001). Die Varianten zeigen keinen Unterschied in ihrer Substratspezifität, jedoch könnte sich ihre Regulierung und/oder ihre subzelluläre Lokalisation unterscheiden (Billich et al., 2003).

Blutgefäßsystem

Arterien und Venen bilden ein geschlossenes System von elastischen Röhren für den Transport des Blutes. Die zwischengeschalteten terminalen Strombahnen dienen vor allem dem Stoffaustausch. Die Blutgefäße sind neuronal, hormonal und autonom reguliert und besitzen neben einer Transport- und Austauschfunktion für zelluläre und nichtzelluläre Blutbestandteile, wie z.B. Blutgase, Nährstoffe, Mineralien, Stoffwechselprodukte, Hormone, Zellen des Immunsystems, Wärme und Wasser, auch mechanische Aufgaben: So beeinflussen der Füllungszustand der Blutgefäße und die Art ihres Einbaus den Turgor der inneren Organe. Außerdem wirkt das Gefäßsystem bei Abwehrvorgängen durch Vasodilatation und erhöhte Permeabilität und bei der spontanen arteriellen Blutstillung durch Invagination mit.

Die Blutgefäße sind elastisch, regenerationsfähig, aktiv verstellbar und durch Bindegewebe im umgebenden Gewebe verankert. Durch die regional sehr unterschiedliche dynamische Beanspruchung differieren die einzelnen Abschnitte des Gefäßsystems in ihrem Aufbau erheblich. Die Arterienwände werden durch die Pulswellen und dem ständig wechselnden Druck, der von der eigenen Wandspannung mit beeinflusst wird, beansprucht. Der Druck in den Venen, obwohl sie über zwei Drittel des Gesamtblutvolumens fassen, ist deutlich geringer und dadurch weniger belastend. Auch das umgebende Gewebe und die von außen wirkenden Kräfte, wie Atem- und Muskelbewegungen, haben Einfluss auf das Gefüge der Gefäßwand. (Benninghoff, Drenckhahn, 2004b).

Allgemeiner Wandaufbau der Blutgefäße

Die Gefäßwände der Arterien und Venen besteht aus drei Schichten: der Tunica intima, media und externa oder adventitia (Abb. 6). Die Tunica adventitia verankert die Gefäße in der Umgebung und nimmt die von außen wirkenden Kräfte, wie z.B. bei Extremitätenbewegungen, auf. Sie besteht vor allem aus Bündeln kollagener Fibrillen, einem lockeren, elastischen Fasernetz, Fibroblasten und Mastzellen (Junqueira et al., 1996; Benninghoff et al., 2004a, b).

Die Tunica media reguliert durch den Spannungszustand ihrer Muskulatur die Lumenweite und wirkt der Dehnung des Gefäßes entgegen. Neben glatten Muskelzellen besitzt die Media

noch kollagene Fibrillen Typ I und III und elastische Fasernetze, die sich nach innen zu der fenestrierten Membrana elastica interna und nach außen zu der Membrana elastica externa verdichten und so die Abgrenzung der Media bilden (Junqueira et al., 1996; Benninghoff et

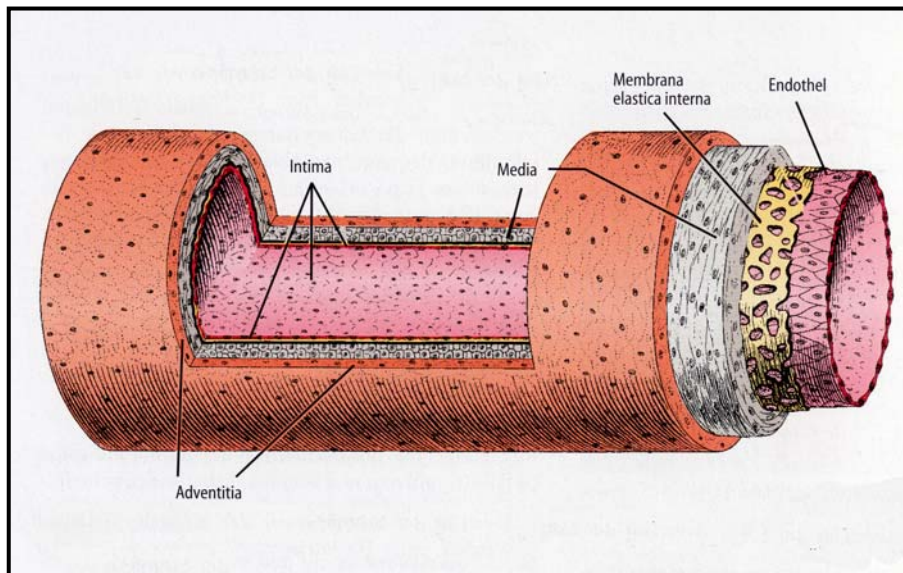


Abb. 6: Allgemeiner Wandaufbau der Blutgefäße (aus Junqueira, 2002)

al., 2004). Die glatten Muskelzellen in der Media einer Arterie bilden keine homogene Population, sondern sie unterscheiden sich in Funktion und Phänotyp der einzelnen Zellen (Walker et al., 1986). Weiterhin zeigen die Myozyten in

Abhängigkeit vom embryonalen Ursprungsgewebe (Gittenberger-de Groot et al., 1998), dem Entwicklungsstadium (adult, neonatal oder fetal) (Frid et al., 1994) oder der Spezies (Archer, 1996) Unterschiede in Morphologie, Zelllokalisation in der Media, Differenzierung und Expression zytoskelettaler und kontraktiler Proteine. Die Myozyten werden morphologisch in die Epitheloid- und Spindel-Form oder funktionell in metabolische und kontraktile Form gegliedert (Hao et al., 2003). Die kontraktile bzw. Spindel-Form enthält entsprechend ihrer mechanischen Funktion vor allem kontraktiles Filamentmaterial, Mitochondrien, wenig ER und viele Caveolae (Junqueira et al., 1996; Benninghoff et al., 2004). Die metabolischen oder epitheloiden Muskelzellen besitzen viele Synthese- und Abbauorganellen, wie raues ER, Lysosome und Golgi-Apparat, aber nur wenige kontraktile Elemente, dadurch produziert eine metabolische Zelle im Vergleich zur kontraktilen Form ein Vielfaches der Menge an extrazellulärer Matrix (Kollagen, nicht-kollagenes Protein, Glykosaminoglykane) (Campbell et al., 1988). Beide Phänotypen kommen in der adulten Gefäßwand vor, jedoch zeigen die metabolischen Myozyten eine Präferenz für die Intima und die kontraktilen Myozyten für die Media (Frid et al., 1997). Neben der Fähigkeit zur Migration und Phagozytose sind die multipotenten Myozyten in der Lage ihren Phänotyp zu ändern und so auf Zytokine (Hillebrands et al., 2003), Wachstumsfaktoren, wie PDGF (Hughes et al., 1996), extrazelluläre Nukleotide, wie ATP (Erlinge, 1998 und 2004), mechanische Stimuli oder

Gefäßverletzungen (Campbell et al., 2000) zu reagieren (Shanahan et al., 1997; Lincoln et al., 2001).

Die Intima ist der Schubwirkung des strömenden Blutes direkt ausgesetzt und besitzt einen glatten Überzug von länglichen, platten Endothelzellen, die parallel zur Gefäßachse angeordnet sind. Unter der Endothelschicht liegt das dünne, bindegewebige Stratum subendotheliale. Dieser allgemeine Aufbau der Gefäßwand-Dreischichtung ist allen Arterien und Venen gemein, jedoch gibt es in der Ausprägung mannigfaltige Unterschiede (Junqueira et al., 1996; Benninghoff et al., 2004).

Die Arterien sind Gefäße des Hochdrucksystems und weisen im Vergleich zu den Venen eine deutlich dickere Tunica media auf. Man unterscheidet hier anhand der Media zwischen

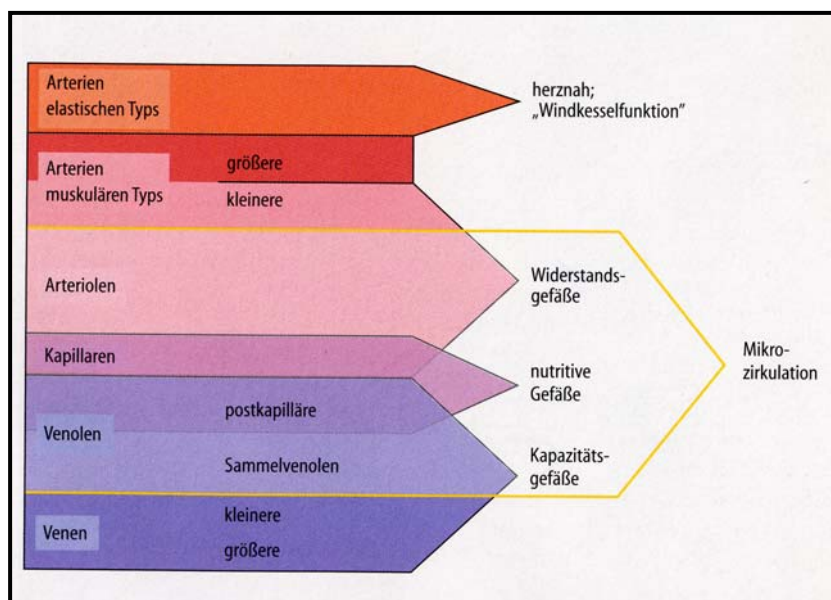


Abb. 7: Gefäße des Kreislaufes (aus Junqueira et al., 2002)

Arterien des elastischen und des muskulären Typs (Abb. 7). Bei den herznahen arteriellen Gefäßen überwiegt der Anteil an elastischem Material und bei herzfernen Abschnitten dominieren die glatten Muskelzellen in der Tunica media. Arterien vom elastischen Typ besitzen durch die Nähe

zum Herzen eine Windkesselfunktion, die für den Ablauf der Pulswelle wichtig ist. Die Media besteht beim Menschen aus 50-70 gefensterten Lamellen, die durch Zusammenlagerung der elastischen Fasern entstehen, und aus kurzen, verzweigten Muskelzellen, die zwischen den Lamellen ausgespannt sind. Dadurch sind die Myozyten in der Lage, die Vorspannung des elastischen Gefäßgerüsts aktiv zu regulieren. Die Tunica media der herzfernen Arterien des muskulären Typs enthält viele, meist in ganz flachen Schraubenzügen angeordnete eng aneinander gelagerte glatte Muskelzellen. Die dazwischen liegenden Bindegewebsfasern treten mit abnehmendem Gefäßdurchmesser immer mehr in den Hintergrund. Die kräftig ausgebildete Muskulatur dieser Arterien reguliert durch Enger- oder Weiterstellung des Gefäßvolumens die Durchflußmenge des Blutes (Bucher et al., 1997; Benninghoff et al., 2004).

Ein weiterer Bestandteil des Blutgefäßsystems ist die terminale Endstrombahn oder auch Mikrozirkulation. Hierzu zählen die Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Die Arteriolen sind die kleinsten Äste des arteriellen Systems. Sie verlieren mit abnehmendem Gefäßvolumen immer mehr Muskulatur und gehen schließlich unter Verlust der Myozyten in Kapillaren über. Die Kapillaren sind mit einem Endothel, das zumeist auf einer Basallamina sitzt, ausgekleidet. Neben den Endothelzellen sind auch noch Perizyten mit ihren verzweigten Zellausläufern an der Ausbildung des Gefäßröhrchens beteiligt. Der Übergang in das venöse System erfolgt über mehrere Schritte: zunehmende Lumenweite, Verschwinden der Perizyten und Auftreten von Myozyten (Bucher et al., 1997; Benninghoff et al., 2004).

Die Venen weisen auch die typische Dreischichtung auf, jedoch ist die Abgrenzung der einzelnen Schichten weniger deutlich als bei den Arterien. Die Wand ist dünner und auch lockerer aufgebaut als die der begleitenden Arterien. Bei den venösen Gefäßabschnitten ist das Bindegewebe, insbesondere die kollagenen Fasern, stark ausgebildet. Die Bündel kollagener Fibrillen formen ein Gerüst, das die Dehnbarkeit des Gefäßes durch Streckung und Spannung begrenzt. Die eher weitmaschigen elastischen Fasernetze sind in Längsrichtung orientiert und leisten so gegen Längsdrehung Widerstand und nicht gegen Querdehnung wie bei den Arterien. Die glatten Muskelzellen sind zu lockeren Bündeln zusammengefasst und werden mit Zunahme des Gefäßvolumens ausgeprägter. Neben dem Gefäßdurchmesser ist auch der Gehalt an Muskulatur in der Venenwand standortabhängig. Im Niederdrucksystem der Venen sorgen von außen wirkende Kräfte, wie z.B. Muskelpumpen, für den Transport des Blutes und Venenklappen verhindern den Rückstrom (Benninghoff et al., 2004).

Dieses Grundbauschema ist in allen Gefäßen und Gefäßsystemen verwirklicht, jedoch bestehen aufgrund der Konstruktion und Lokalisation auch erhebliche Unterschiede. Einige Organe (Herz, Lunge, Leber) besitzen anatomisch getrennte Vasa publica und Vasa privata, meistens ist jedoch nur eine funktionelle Trennung der Kreisläufe zu beobachten (Haut, Niere, Milz, Darm). Auch bei der terminalen Endstrombahn lassen sich neben den Netzarterien auch Besonderheiten feststellen: arterielle (Niere) und venöse (Hypophyse, Leber) Rete mirabiles, absolute (Gehirn) und funktionelle (Darm) Endarterien. Durch diese speziellen Variationen in der Architektonik der Blutstromwege besitzt jedes Organ ein eigenes, charakteristisches Gefäßmuster (Benninghoff et al., 2004).

Zielsetzung

Obgleich die Gruppe der bioaktiven Lipide im Allgemeinen und die Sphingolipide im Besonderen in Prozesse wie Differenzierung und Proliferation, aber auch in die Kontrolle von Atemwegen und Blutgefäßen integriert sind, existieren über die Orte der S1P-Synthese nur wenige Daten. Gerade die Kenntnis der gewebe- und zellspezifische Lokalisation bildet aber eine essenzielle Voraussetzung a) zum Verständnis der Funktion der Sphingolipide im Organ/Körper und b) zur Entwicklung bzw. Weiterentwicklung pharmakologischer Substanzen. Die Immunhistochemie bietet die Möglichkeit Zellen in Gewebeschnitten zu identifizieren, die bestimmte Moleküle besitzen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Studie die Lokalisation der SPHK1a durch den immunhistochemischen Nachweis des Proteins untersucht. Hierbei standen die Bestimmung von SPHK1a-enthaltenden Zellen und die organabhängige Verteilung der Zellen insbesondere im Gefäßbett im Vordergrund. Neben dem Vorkommen der SPHK1a im Gefäßsystem wurden nicht zum Gefäßbett gehörende SPHK1a-positive Zellen immunhistochemisch charakterisiert.

2. Material und Methoden

Material

Reagenzien und Lösungen

Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4

230 ml Stammlösung A (0,1 M NaH_2PO_4) (Merck, Darmstadt),

770 ml Stammlösung B (0,1 M Na_2PO_4) (Merck, Darmstadt)

Blocklösung

10 % normales Schweineserum (Schlachthof Marburg),

0,5 % Tween 20 (Merck, Darmstadt),

0,1 % bovines Serumalbumin (Sigma, Steinheim)

in PBS

Carbonatgepuffertes Glycerol

Carbonatpuffer (0,5 M NaHCO_3 (Merck, Darmstadt) mit 0,5 M Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt), pH 8,6) und Glycerol (Merck, Darmstadt) im Verhältnis 1:2

PBS (Phosphate-buffered saline - Natriumphosphatpuffer)

28,75 ml 0,2 M NaH_2PO_4 (Merck, Darmstadt),

96,20 ml 0,2 M Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt),

22,4 g NaCl (Merck, Darmstadt)

ad Aqua dest. auf 5000 ml, pH 7,4

PBS + S

PBS mit doppelter NaCl Menge

Geräte

Gefriermikrotom

Leica CM 1900 (Leica, Bensheim)

Auflichtfluoreszenzmikroskop

Olympus BX 60 (Olympus, Hamburg)

Zeiss Axioplan 2 imaging mit Software Axio Vision, Version 3.0.6. SP2 (Zeiss, Jena)

Konfokales Laser Scanning Mikroskop

CLSM, TCS SP2 (Leica, Bensheim)

Antisera/-körper

Tab. 1: Primärseren/-antikörper

Primärseren/-antikörper				
Antigen	Wirtsspezies	Klon/Code	Verdünnung	Bezugsquelle
Sphingosinkinase 1a (SPHK1a) (C-Terminus, 16 Aminosäurereste)	Kaninchen		1:400	Y. Banno, Gifu, Japan
Alpha-smooth-muscle-actin (SMA)	Maus	mAb 1A4	1:500	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Neurofilament 68 (NF 68)	Maus	mAb NR 4	1:300	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Vimentin	Ziege	V 4630	1:100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rat prolyl 4-hydroxylase (rPH(β))	Maus	mAb 6- 9H6	1:3000	Medicorp, Montréal, Québec, Kanada
CD68	Maus	mAb ED1	1:400	Serotec, Düsseldorf
CD163	Maus	mAb ED2	1:800	Serotec, Düsseldorf
MHC II	Maus	mAb OX6	1:800	Camon, Wiesbaden

Tab. 2: Sekundärseren

Sekundärseren				
Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen-IgG	Esel	Indocarbocyanin (Cy 3)	1:2000	Chemicon, Hofheim
Ziegen-IgG	Maus	Fluorescein- Isothiocyanat (FITC)	1:200	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Maus-IgG (Fab)	Esel	FITC	1:400	Dianova, Hamburg

Filter bei der Fluoreszenzmikroskopie

Tab. 3: Filter

Filter				
Name	Fluorochrom	Dichroischer Filter	Erregerfilter	Sperrfilter
MBA	FITC	455 nm	460-490 nm	515-50 nm
WIY	Cy 3	600 nm	454-580 nm	610 nm
UV-Filter		455 nm	400-410 nm	455 nm

Methoden

Gewebeaufbereitung

Gewebebegewinnung

Die ausgewählten Versuchstiere, Wistar-Ratten (n=10), stammten aus dem Tierstall des Physiologischen Institutes der Universität Gießen. Nach der Tötung durch Überdosierung mit einem Narkotikum (Isofluran, Abbott, Wiesbaden) wurden den Ratten die entsprechenden Gewebe (Tab. 4) unfixiert entnommen, in Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und zur Kryoprotektion mit flüssigem Stickstoff (Messer-Griesheim, Griesheim) in Isopentan schock gefroren. Die Zwischenlagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -80°C .

Von den tief gefrorenen Geweben wurden mit einem Gefriermikrotom $10\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und auf Super Frost Plus Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen) aufgetragen. Anschließend wurden die Objektträger für 20 Minuten in -20°C kaltes Aceton (Merck, Darmstadt) bzw. Isopropanol (Merck, Darmstadt) überführt. Die Gewebeschnitte trockneten für eine Stunde bei Raumtemperatur und wurden mit einem Fettstift (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) umrandet.

Aufbereitung der Lungenpräparate

Nach Tötung der Ratte wurde der Thorax eröffnet und die Trachea frei gelegt. Es wurde eine Kanüle in die Trachea eingeführt und durch eine Ligatur fixiert. Die Trachea wurde mit liegender Kanüle abgesetzt und das Thoraxpaket entnommen. Das Herz wurde vom Thoraxpaket entfernt und entsprechend dem Protokoll weiterbearbeitet (s. Gewebebegewinnung). Nun wurde über die Kanüle ca. 6-8 ml mit PBS verdünntes Tissue Tek (1:1) in die Lunge appliziert bis diese prall gefüllt war. Danach wurde die Lunge in Tissue Tek eingebettet und in Isopentan schock gefroren. Die weitere Verarbeitung entsprach dem Protokoll der Gewebebegewinnung. Durch die Technik der Lungenblähung war es möglich, auch die kleineren Bestandteile des Lungenparenchyms wie Ductuli und Alveolen gut unter dem Fluoreszenzmikroskop abzugrenzen.

Entnommene Gewebe

Zur Untersuchung des **Herz-Kreislauf-Systems** wurden neben dem zentralen Kreislauforgan Herz auch Arterien vom elastischen Typ, Aorta thoracica und abdominalis sowie A. carotis communis, mit den zahlreichen charakteristischen Elastinlamellen und Arterien vom muskulären Typ, A. mesenterica superior und A. femoralis, die durch eine muskelzellreiche Media gekennzeichnet sind, präpariert. Um die Blutgefäßversorgung der verschiedenen Organe und deren terminale Endstrombahn näher betrachten zu können, wurden die entsprechenden Organe präpariert und einzeln untersucht.

In **Atemwegen** wurden Anteile der luftleitenden Abschnitte, wie Trachea, Bronchien und Bronchioli, und Bereiche von respiratorischen Abschnitten der Lunge wie Bronchioli respiratorii und Alveolen untersucht.

Bei der Untersuchung des **Gastrointestinaltrakts** wurden neben Darmanteilen des Ösophagus, Duodenums und Jejunums auch die großen **Verdauungsdrüsen** Leber, Pankreas und zusätzlich die Zunge präpariert.

Eine weitere Drüse, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist die **Nebenniere** als hormonproduzierendes, endokrines Organ.

Die entnommenen **neuronalen Gewebe** gehörten zum zentralen Nervensystem, Cerebrum und Cerebellum, oder zum peripheren Nervensystem: Spinalganglien, bestehend aus pseudounipolaren Neuronen, und der N. ischiadicus als gemischter sensibel-motorisch-autonomer Nerv.

Der **Bewegungsapparat** wurde anhand der Skelettmuskulatur untersucht. Hierbei wurde stellvertretend der M. biceps brachii präpariert.

Die Niere, als wichtiges Kreislauforgan, und der Uterus wurden zur Untersuchung des **Urogenitaltraktes** herangezogen.

Tab. 4: Untersuchte Gefäßgebiete

Untersuchte Gefäßgebiete	
Organsystem	Entnommene Gewebe
Herz-Kreislauf-System	Atrium, Ventrikel Aorta thoracica und abdominalis, A. carotis communis A. mesenterica superior, A. femoralis
Atemwege	Trachea Lunge
Gastrointestinaltrakt	Ösophagus, Duodenum, Jejunum, Leber, Pankreas, Zunge
Nervensystem	Cerebrum, Cerebellum, Spinalganglien, N. ischiadicus
Urogenitalsystem	Niere, Uterus
Nebenniere	Nebenniere
Bewegungsapparat	M. biceps brachii

Immunhistochemie

Einfache Immunfluoreszenz

Indirekte Immunfluoreszenz

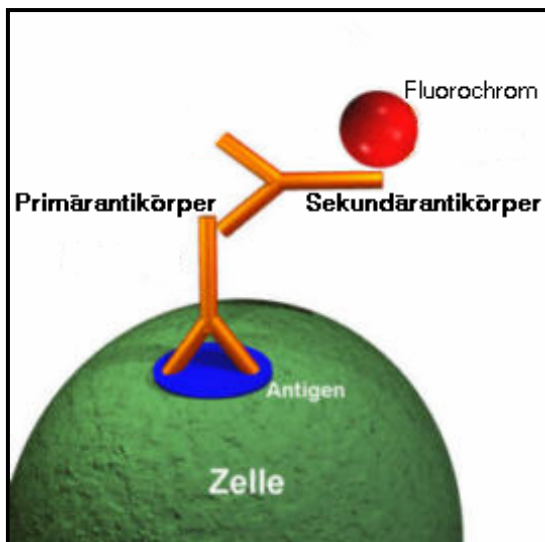


Abb. 8: Indirekte Immunfluoreszenz

In einem ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt, indem die Gewebeschnitte bei Aceton-Fixierung mit Blocklösung (s. Material - Reagenzien und Lösungen) bzw. bei Isopropanol-Fixation mit 50 % normalem Schweineserum in PBS (s. Material - Reagenzien und Lösungen) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Anschließend wurde die Blocklösung bzw. das Schweineserum abgesaugt und die Primärantikörper in der angegebenen Verdünnung (Tab. 1) in PBS + S

auf die Schnitte aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um die nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurden die Gewebeschnitte zwei Mal für 10 Minuten mit PBS gespült und anschließend wurde die Spüllösung wieder abgesaugt. In einem weiteren Inkubationsschritt wurden nun die Sekundärantikörper in der angegebenen Verdünnung (Tab. 2) in PBS für eine Stunde auf die Objektträger aufgebracht. Wegen der möglichen Reduktion der Fluoreszenz wurden die Schnitte in Dunkelheit gelagert. Anschließend folgten zwei weitere Spülungen für je 10 Minuten. Zur Stabilisierung der Antikörperbindungen wurden die Objektträger für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd überführt und danach wurde durch zweimaliges Spülen mit PBS für je 10 Minuten das im Gewebe verbliebene Paraformaldehyd ausgewaschen. In einem letzten Bearbeitungsschritt wurden alle Gewebeschnitte in gepuffertem Glycerol (s. Material - Reagenzien und Lösungen) eingebettet und bis zur Auswertung am Mikroskop bei -20°C aufbewahrt.

Bei der Verwendung von biotinylierten Sekundärantikörpern kam nach dem einstündigen Ansatz mit den Sekundärantikörpern noch eine weitere einstündige Inkubation mit dem Steptavidin-Cy3-Komplex und anschließendes zweimaliges Spülen für 10 Minuten hinzu.

Direkte Immunfluoreszenz

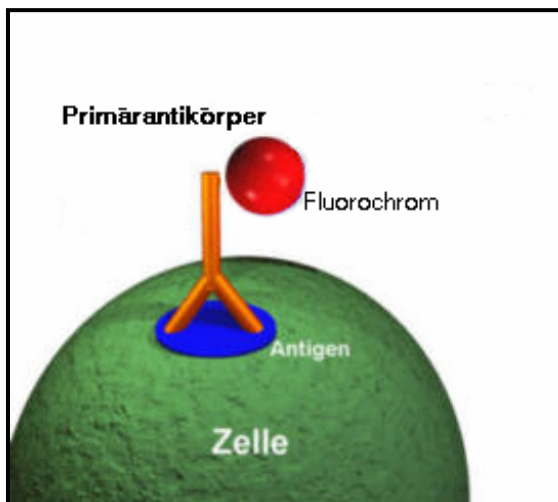


Abb. 9: Direkte Immunhistochemie

Bei dieser immunhistochemischen Technik sind die Primärantikörper direkt mit einem Fluorochrom verbunden. Dementsprechend vereinfachte sich die Prozedur (s. indirekte Immunfluoreszenz) erheblich. Nach einstündiger Blockung der Gewebeschnitte wurden diese mit den Primärantikörpern in der angegebenen Verdünnung (Tab. 1) unter Vermeidung von Lichtbestrahlung über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper durch 2 Spülungen

mit PBS für 10 Minuten vom Gewebe entfernt. Die Objektträger wurden für 10 Minuten in 4 % Paraformaldehyd überführt, zwei Mal für 10 Minuten in PBS gewaschen, in gepuffertes Glycerol eingebettet und bis zur Auswertung bei -20 °C zwischengelagert.

Doppelimmunfluoreszenz

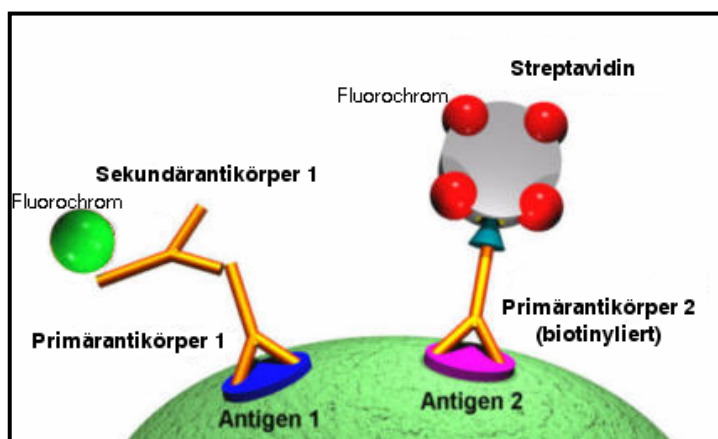


Abb. 10: Doppelimmunfluoreszenz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch verschiedene Doppelimmunfluoreszenzen durchgeführt. Die Vorgehensweise entsprach grundsätzlich der Methode der einfachen Immunfluoreszenz (s. korrespondierenden Abschnitt), nur wurden hierbei die Gewebeschnitte gleichzeitig mit beiden Primärseren inkubiert. Nach den beiden

Spülungen mit PBS folgte die einstündige Inkubation mit den beiden entsprechenden Sekundärantikörpern unter Vermeidung von Lichtbestrahlung zur Erhaltung der Immunfluoreszenz. Anschließend wurden zwei zehnminütige Spülungen mit PBS durchgeführt.

Nach zwei weiteren Spülungen mit PBS wurden die Objektträger für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd überführt und anschließend wieder zwei Mal für 10 Minuten in PBS gewaschen. In einem letzten Bearbeitungsschritt wurden die Gewebeschnitte in gepuffertes Glycerol eingebettet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengelagert.

Bei der Verwendung von Biotin-Steptavidin-Verbindungen ergab sich ein abgewandeltes Prozedere: Nach der Inkubation mit den Primärkörpern und anschließender Spülung erfolgt eine Inkubation mit den biolinylierten Sekundärantikörpern für eine Stunde. Die Objektträger wurden nun 2 Mal für 10 Minuten mit PBS gespült und für eine Stunde mit dem Streptavidin-Fluorchrom-Konjugat inkubiert. Es erfolgten zwei Spülungen mit PBS für je 10 Minuten und die Überführung der Gewebeschnitte für 10 Minuten in 4 % Paraformaldehyd. Die weiteren Bearbeitungsschritte entsprachen wieder dem unveränderten Protokoll (s. indirekte Immunfluoreszenz).

Spezifitätskontrolle

Präabsorption

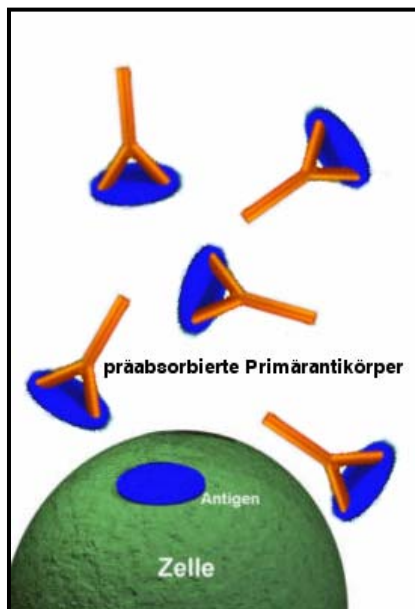
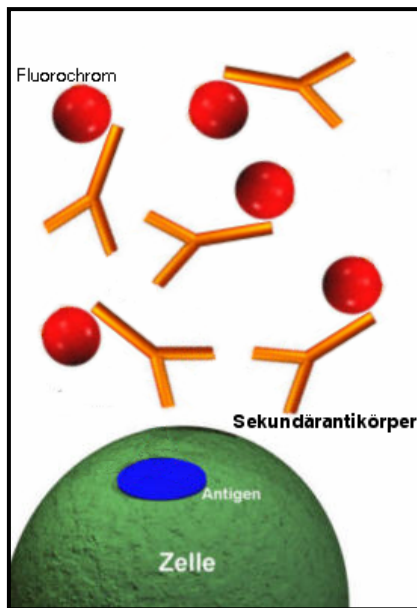


Abb. 11: Präabsorption

Zur Kontrolle der Epitop-spezifischen Bindung des Antikörpers wurden Präabsorptionen durchgeführt. Dabei wurde der Primärantikörper mit dem Protein/Peptid, gegen das er gerichtet ist, in der angegebenen Verdünnung (Tab. 1) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dieser Lösung wurde anschließend eine indirekte Immunfluoreszenz (s. korrespondierenden Abschnitt) durchgeführt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bzw. konfokalem Laser Scanning Mikroskop ausgewertet. Bei Epitop-spezifischer Bindung des Primärantikörpers sollte keine Immunfluoreszenz zu erkennen sein, da der Antikörper schon vor der Inkubation spezifisch gebunden und daher die Bindungsstelle blockiert ist.

Negativ-Kontrolle



Mit der Negativ-Kontrolle wurde die unspezifische Bindung der Sekundärantikörper überprüft. Hierbei wurden die Gewebeschnitte nicht mit den Primärantikörpern, sondern nur mit PBS über Nacht inkubiert. Die nachfolgenden Bearbeitungsschritte entsprechen wieder dem Protokoll der indirekten Immunfluoreszenz (s. entsprechenden Abschnitt). Bei optimalen Sekundärseren sollte keine Immunfluoreszenz erkennbar sein, da es durch das Fehlen der Primärantikörper keine Bindungsstelle für das Sekundärserum gibt.

Abb. 12: Negativ-Kontrolle

Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop und einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung verschiedener Filterkombinationen (Tab. 4). Die Filter wurden entsprechend der Exzitations- und Emissionsspektren (Abb. 13 und 14) der verwendeten Fluorochrome der Sekundärseren gewählt.

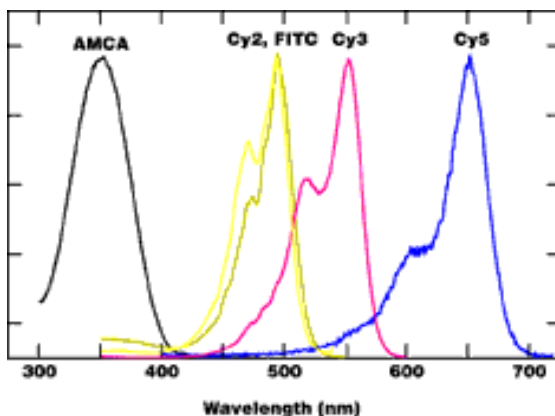


Abb. 13: Fluorochrom-Exzitationsspektren

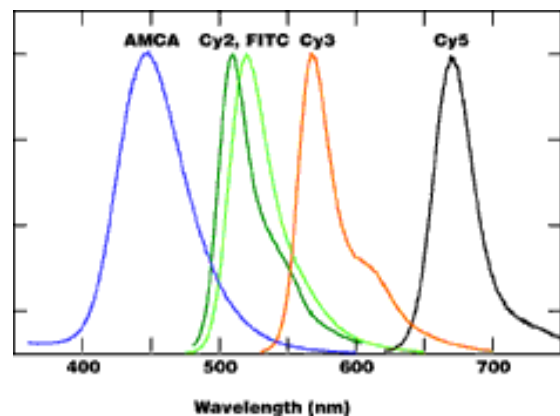


Abb. 14: Fluorochrom-Emissionsspektren

Die Ergebnisse wurden mit einem Videodokumentationssystem und einer Bildverarbeitungssoftware bearbeitet und als Dateien (tiff- oder jpg-Formate) gespeichert. Bei einigen Abbildungen reichte die Signalstärke der SPHK1a-Immunfluoreszenz für das konfokale Laser Scanning Mikroskop nicht aus, daher wurde auf Aufnahmen des Aufricht-Fluoreszenzmikroskops zurückgegriffen.

Allgemeine Informationen zum Ablauf der immunhistochemischen Untersuchungen

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Studien zur Lokalisation der SPHK1a in verschiedenen Organ- und Gefäßsystemen der Ratte durchgeführt. Bisherige Studien zur Untersuchung der SPHK1 beschränkten sich auf Protein- bzw. RNA-Nachweise (Western- und Northernblot) und Enzymaktivitätsuntersuchungen in Gewebehomogenaten oder speziellen Zelllinien (Kohama et al., 1998; Liu et al., 2000; Fukuda et al., 2003). Infolgedessen fehlen essenzielle Informationen über die exakte zell- und gewebespezifische Lokalisation der SPHK1a. Lediglich in einer Arbeit wurde immunhistochemisch die SPHK1a in humanem Gewebe untersucht (Murate et al., 2001). Das in der Untersuchung genutzte SPHK1a-Antiserum ist gegen die Aminosäuresequenz (APSGRDSRRGPPPEEP) am C-Terminus des Proteins gerichtet und besitzt eine hohe Spezifität, die durch Westernblot-Analysen, Immunpräzipitation und Enzymaktivitätsmessungen an speziellen Zellreihen, Bakterien- und Gewebehomogenaten überprüft und für Mäuse-, Ratten- und humane Gewebe verifiziert wurde (Murate et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Spezifität der Antikörperbindung durch Präabsorptionsuntersuchungen (s. Protokoll Präabsorption) an verschiedenen Rattengeweben bestätigt. Die Markierung war sowohl an vaskulären und nicht-vaskulären glatten Muskelzellen als auch an nicht-muskulären Zellen nach Präabsorption nicht mehr sichtbar. Lediglich in der Niere erwies sich die SPHK1a-Immunreaktivität der nicht-muskulären, interstitiellen Zellpopulation als nicht präabsorbierbar. Falsch-positive Ergebnisse aufgrund von unspezifischen Bindungen des Sekundärserums konnten durch Negativ-Kontrollen (s. entsprechenden Abschnitt) ausgeschlossen werden.

Bei den immunhistochemischen Versuchen zur Lokalisation der SPHK1a wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit SPHK1a-Primärserum und verschiedenen anderen Primärseren/-antikörpern zur Identifikation der SPHK1a-immunreaktiven Zellen

durchgeführt. Bei der Erstuntersuchung der verschiedenen Gewebe wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit SPHK1a-Primärserum und SMA-Primärantikörper benutzt, da hierbei die SMA-reaktiven glatten Muskelzellen gut abzugrenzen und so die Gefäße außerhalb der terminalen Strombahn gut zu erfassen waren. Durch diese erste Untersuchungsreihe wurden in einigen Organen nicht-SMA-positive, aber SPHK1a-immunreaktive Zellen und Strukturen entdeckt, bei denen eine genaue Identifizierung und Zuordnung zu einer Zellart nicht möglich war. Dadurch waren weitere Charakterisierungen mit unterschiedlichen Antikörperkombinationen notwendig. Vimentin markiert Fibroblasten im Uterus (Varayound et al., 2001). Die im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte rPH(β) (John et al., 1996) ist ein für Fibroblasten charakteristisches Enzym (Fähling et al., 2004; Berger et al., 2005). NF68 ist ein Marker myelinisierter Nervenfasern (Wiksten et al., 2004). MHCII, CD68 und CD163 charakterisieren Zellen des lymphatischen Systems (Dijkstra et al., 1985; Gjomarkaj et al., 1999; Larmonier et al., 2003). Durch diese weiterführenden Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen konnte zumeist die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Zellarten geklärt werden.

Durch Voruntersuchungen wurden die Inkubationsbedingungen hinsichtlich des eingesetzten Fixativs, der Blockungsreagenzien und der optimalen Verdünnung des Antiserums optimiert. Es wurden von einigen Geweben Parallelschnitte angefertigt und diese mit verschiedenen Fixantien - Aceton und Isopropanol - versetzt. Anschließend wurde eine immunhistochemische Untersuchung der Gewebeschnitte entsprechend dem Routine-Protokoll (s. indirekte Immunfluoreszenz) durchgeführt, um die Stärke und Lokalisation der SPHK1a-Immunreaktivität (SPHK1a-IR) zu bestimmen. Die Objektträger wurden unter dem Auflichtfluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3. Ergebnisse

Bei den untersuchten Organen beziehen sich die Ergebnisse zunächst auf die immunhistochemischen Versuche mit Aceton-fixiertem Gewebe. Gegebenenfalls folgen im Anschluss noch die Resultate der Isopropanol-fixierten Gewebe, wenn ein fixierungsabhängiger Unterschied beim Verteilungsmuster der SPHK1a-IR im Gewebe vorlag.

Die Immunreaktivität der untersuchten Gewebe wurde nach einer subjektiven Einteilung mit keiner, geringer, starker oder sehr starker Immunfluoreszenz semi-quantitativ bewertet (tabellarische Darstellung mit: -, +, ++, +++).

Präabsorption

Präabsorptionsuntersuchungen zum Nachweis der spezifischen Antikörperbindung wurden an Duodenum, Lunge, Niere und Uterus durchgeführt. Exemplarisch werden hier Abbildungen der Präabsorptionsuntersuchungen des Uterus und des Duodenums gezeigt (Abb. 15-17). Die Präabsorbierbarkeit der SPHK1a-IR konnte sowohl bei den glatten Muskelzellen als auch bei den nicht-muskulären Zellen nachgewiesen werden.

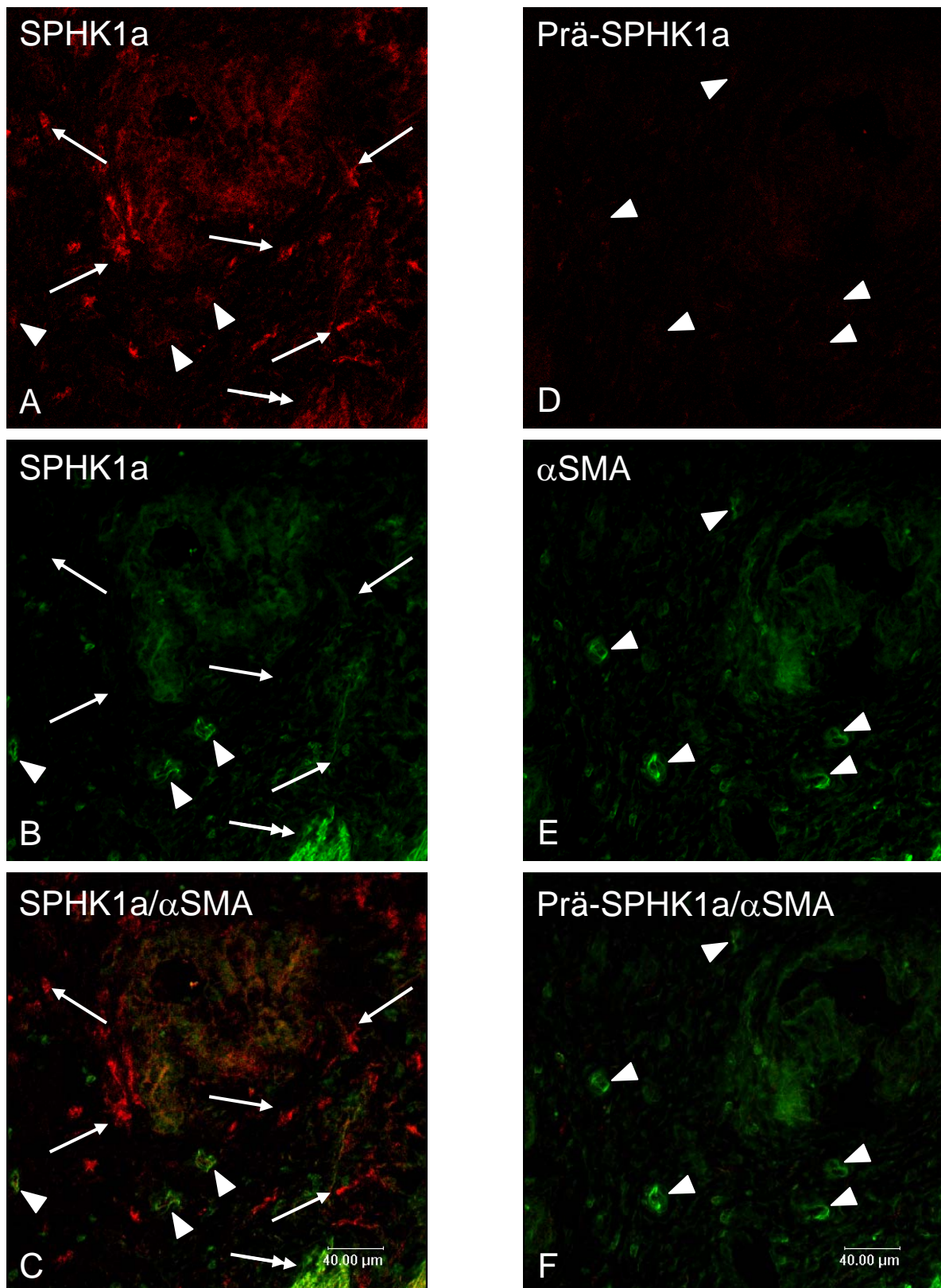


Abb. 15: Uterus, Präabsorption der nicht-muskulären SPHK1a-immunreaktiven Zellen

Die SPHK1a-immunreaktiven interstitiellen Zellen (A: →) zeigen im Parallelschnitt der Präabsorptionsuntersuchung keine SPHK1a-IR (D). Die glatten Muskelzellen des Myometriums (B: Doppelpfeil) sowie der Spiralarterien (B, E: ►) weisen eine αSMA-IR auf. Die glatte Muskulatur des Uterus zeigt eine sehr starke SPHK1a-IR (A: →).

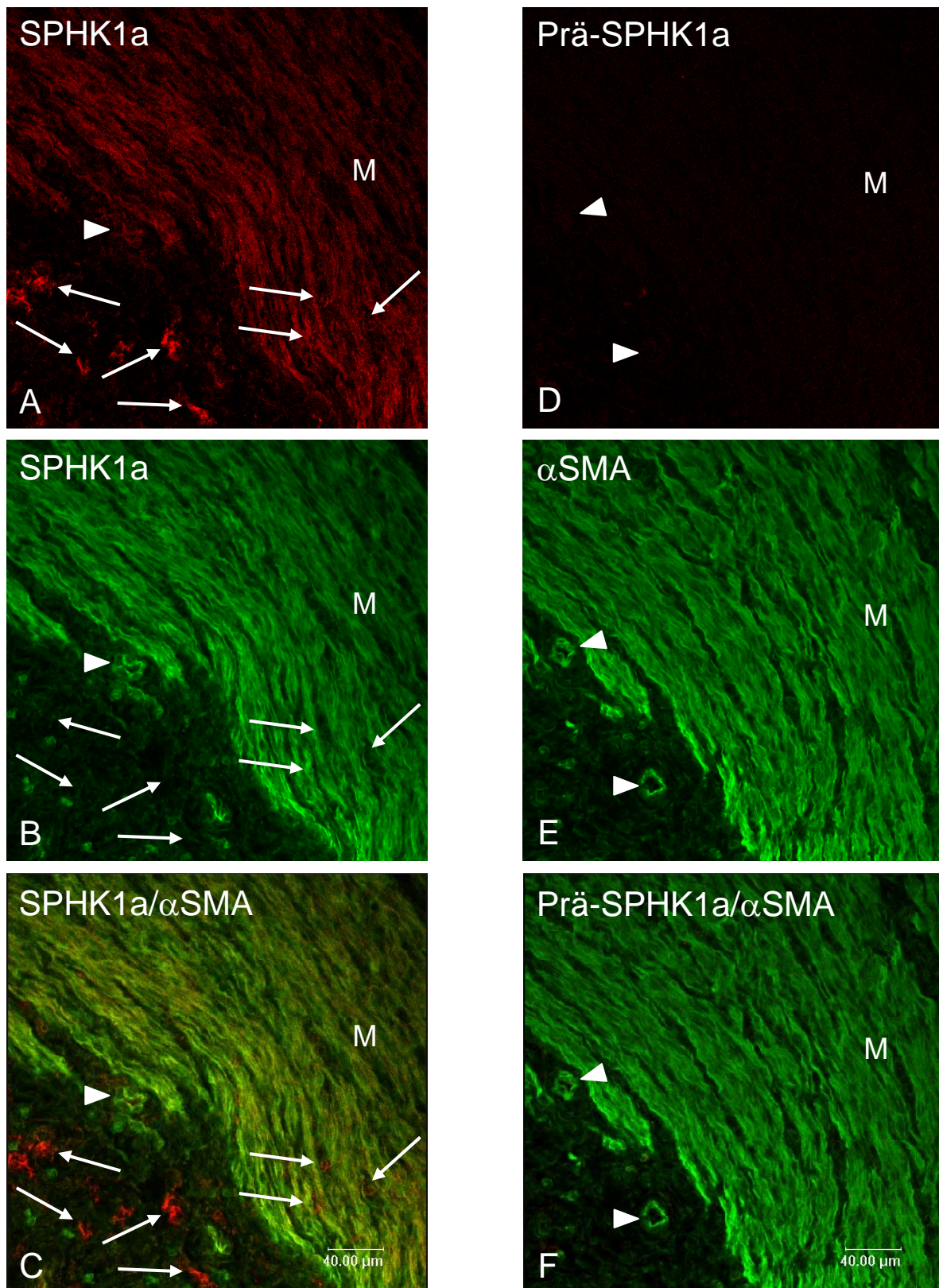


Abb. 16: Uterus, Präabsorption der SPHK1a-IR der glatten Muskulatur

Die glatte Muskulatur des Myometriums (B: M) zeigt eine sehr starke SPHK1a-IR (A: M). Die vaskulären glatten Muskelzellen (B: →) weisen eine starke SPHK1a-IR auf (A: →). Die interstitiellen SPHK1a-immunreaktiven Zellen zeigen eine sehr starke IR. Die glatten Muskelzellen des Myometriums (E: M) und der Gefäße (B: ►) zeigen eine präabsorbierbare SPHK1a-IR (A: M, ►). Weiterhin ist auch eine SPHK1a-IR der interstitiellen Zellen in der Präabsorptionsuntersuchung nicht nachweisbar (D).

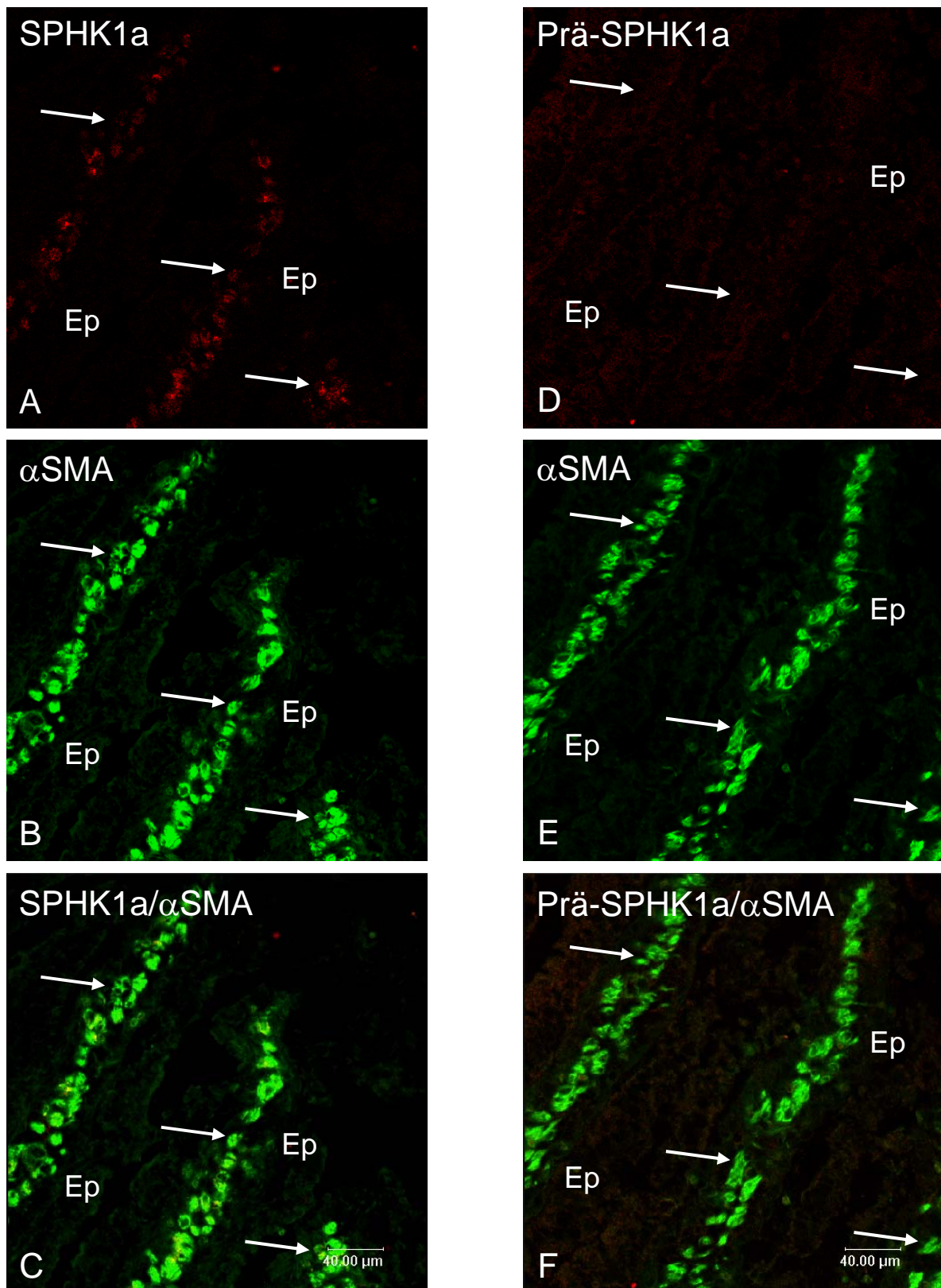


Abb. 17: Duodenum, Präabsorption der nicht-vaskulären glatten Muskulatur
 Die Lamina epithelialis mucosae (Ep) weist keine IR auf, dagegen zeigt die Lamina muscularis mucosae (B: →) eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A: →). In der Präabsorption zeigen die glatten Muskelzellen (E: →) in den Zotten keine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (D: →).

Blutgefäß- und Kreislaufsystem

Gefäße des Körperkreislaufs

Die entnommenen großen Arterien vom elastischen Typ, Aorta thoracica (Abb. 18), Aorta abdominalis (Abb. 19, 20) und A. carotis communis (Abb. 21), sowie vom muskulären Typ, A. mesenterica superior (Abb. 22) und A. femoralis (Abb. 23), zeigten ein identisches Verteilungsmuster der SPHK 1a-IR: Die Tunica intima, bestehend aus Endothel, Stratum subendotheliale und Membrana elastica interna, wies keine SPHK1a-IR auf. Bei der Tunica media konnte eine starke Fluoreszenz der glatten Muskelzellen beobachtet werden. Die Tunica adventitia zeigte eine starke SPHK1a-IR der Gefäßmedia der Vasa vasorum, die weiteren Strukturen jedoch, wie Fibroblasten, Kollagenfasern und elastische Faser-Netze, zeigten keine SPHK1a-IR.

Bei den die großen Arterien begleitenden Venen, V. jugularis interna, V. femoralis (Abb. 23) und V. mesenterica superior (Abb. 22), konnte, vergleichbar den Untersuchungsergebnissen der Arterien, eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen der Tunica media festgestellt werden. Die Tunica intima der venösen Gefäße zeigte wie schon bei den parallel verlaufenden Arterien keine SPHK1a-IR.

Die zufällig angeschnittenen venösen und arteriellen Gefäßabgänge wiesen eine starke SPHK1a-IR der Tunica media auf. Bei den großen muskelstarken Gefäßabgängen der aortalen Hauptäste konnte eine sehr starke SPHK1a-IR nachgewiesen werden, die die ihrer Ursprungsgefäße noch übertraf. Die Intensität der SPHK1a-IR nahm mit Verringerung des Gefäßdurchmessers ab.

Die marklosen Nervenfasern des Plexus aorticus abdominalis zeigten keine SPHK1a-IR (Abb. 19).

Tab. 5: SPHK1a-IR der Gefäße des Körperkreislaufs

	SPHK1a-IR	
Aorta und Stammarterien	Endothel	Tunica media
Aorta thoracica	-	++
Aorta abdominalis	-	++
A. carotis communis	-	++
A. femoralis	-	++
A. mesenterica superior	-	++
Venöse Gefäße	Endothel	Tunica media
V. jugularis interna	-	++
V. femoralis	-	++
V. mesenterica superior	-	++
Neuronale Gewebe		
Plexus aorticus abdominalis	-	

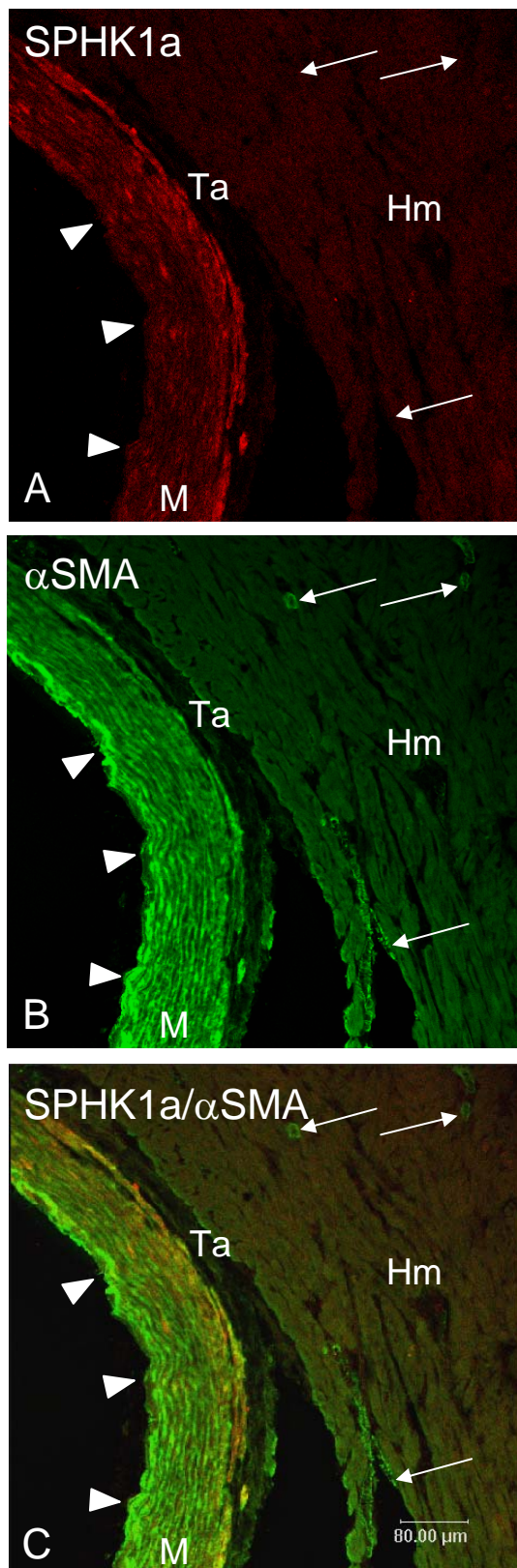


Abb. 18: Aorta thoracica

Die glatten Muskelzellen der Tunica media (B: M) zeigen eine starke SPHK1a-IR (A: M), das Gefäßendothel (►) hingegen ist nicht markiert. Die äußeren Muskelzellschichten der Tunica media sind stärker SPHK1a-immunreaktiv als die inneren (A: M). Das Bindegewebe der Tunica adventitia (Ta) und die umgebende Herzmuskulatur (Hm) weisen keine SPHK1a-IR auf. Die glatten Muskelzellen der kleineren atrialen Gefäße (B: →) lassen keine SPHK1a-IR erkennen (A: →).

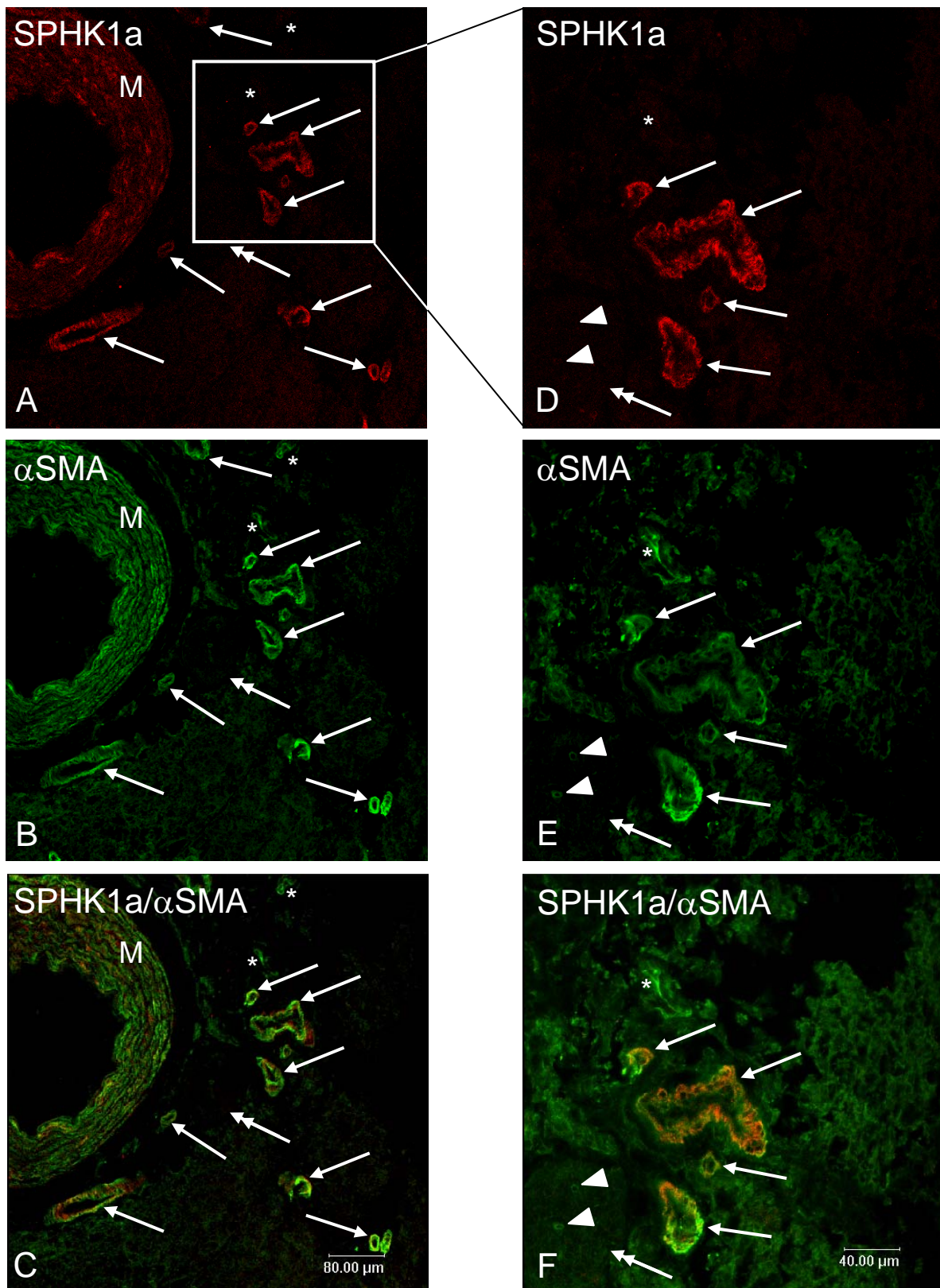


Abb. 19: Aorta abdominalis mit Plexus aorticus abdominalis

Die Aorta abdominalis zeigt eine starke SPHK1a-IR (A: M) der glatten Muskelzellen (B: M), auch die Tunica media der kleineren Gefäße (B: →) des umgebenden Fettgewebes lassen eine starke SPHK1a-IR erkennen (A: →). Die angeschnittenen kleinen dünnwandigen Venen (*) weisen keine SPHK1a-IR der glatten Muskulatur auf. Sowohl der im nicht-reaktiven Fettgewebe verlaufende Nerv des Plexus aorticus abdominalis (Doppelpfeil) als auch die kleinen intraneuralverlaufenden Vasa nervorum (E: ►) zeigen keine SPHK1a-IR (D: ►).

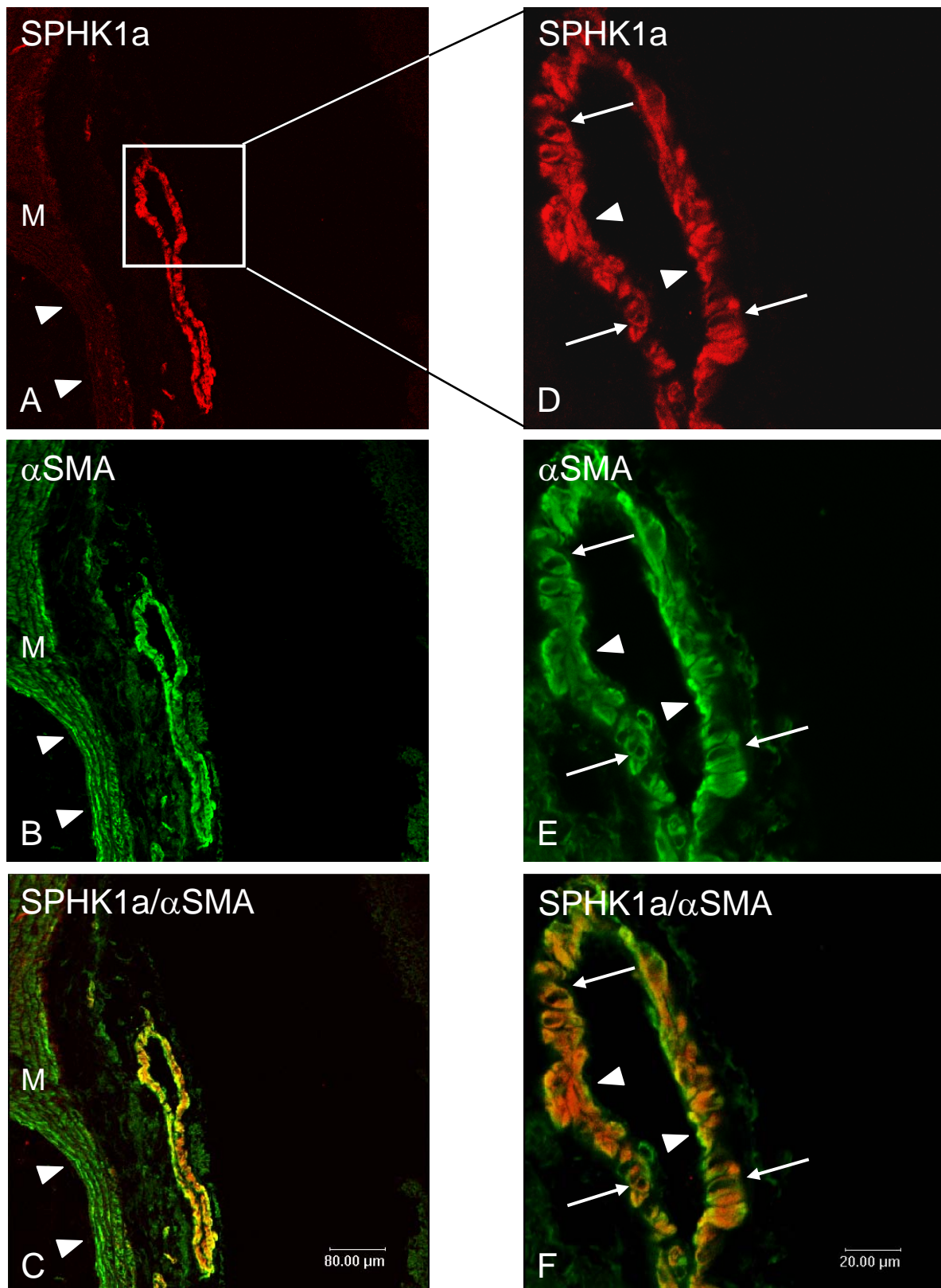


Abb. 20: Aorta abdominalis mit venösem Gefäß

Die Tunica media der Aorta abdominalis (B: M) zeigt eine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A: M). Die Intensität der SPHK1a-IR ist hier jedoch weniger stark als bei der Vene im nicht-reaktiven paraaortalen Bindegewebe (A: □). Da nur das Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzellen (E: →) eine sehr starke SPHK1a-IR aufweist, sind die zentralen nicht-reaktiven Nuclei bei stärkerer Vergrößerung sehr gut abzugrenzen (D: →). Das Endothel (►) zeigt weder bei der Arterie noch bei der Vene eine SPHK1a-IR (A, D).

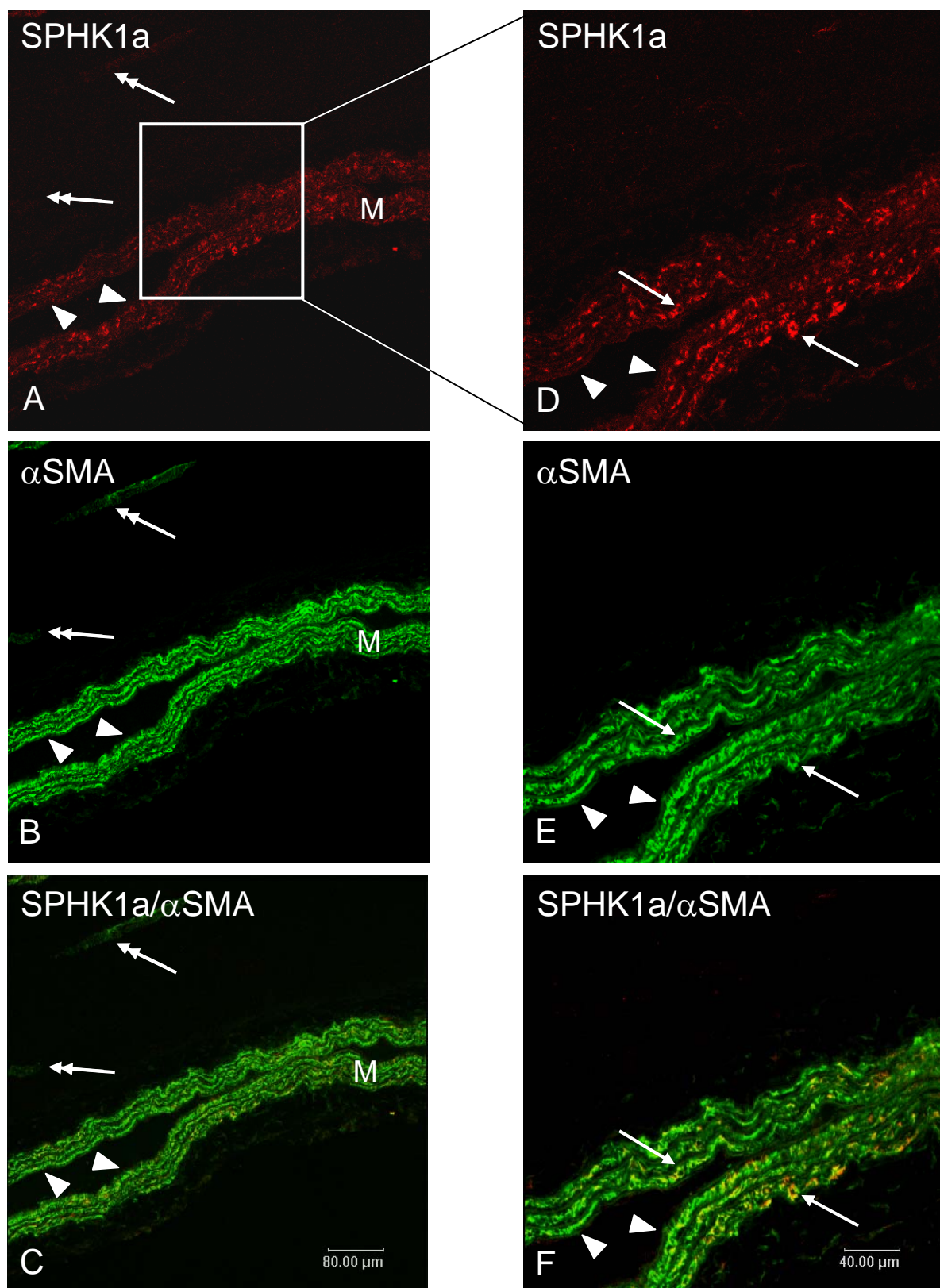


Abb. 21: A. carotis communis

Die A. carotis communis zeigt eine gleichmäßig starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (B: M) in allen Bereichen der Tunica media (A: M). Neben der A. carotis communis sind noch kleinere Gefäße mit einer geringen SPHK1a-IR der Myozyten erkennbar (Doppelpfeil). Bei höherer Vergrößerung lassen sich einzelne Muskelzellen mit ihren zentral gelegenen nicht-reaktiven Nuclei abgrenzen (→). Die Endothelzellen der A. carotis communis weisen keine SPHK1a-IR auf (A, D: ►).

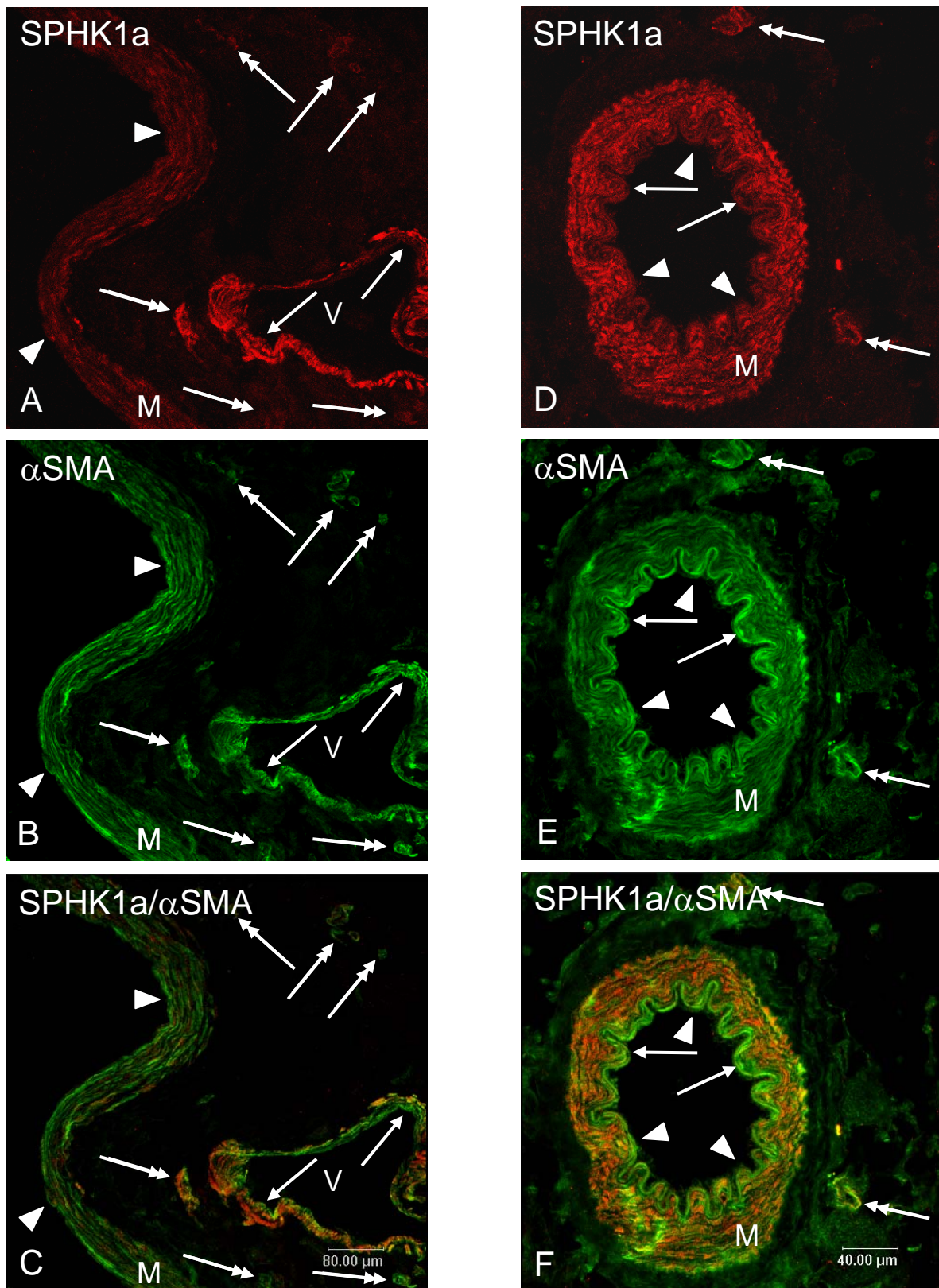


Abb. 22: A. mesenterica superior

Die Tunica media der A. mesenterica superior (B, E: M) zeigt eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A, D: M). Die Tunica media der A. mesenterica sup. (D-F: M) und die der Vene (V) zeigen, dass einige direkt unter der Membrana elastica interna gelegenen glatten Muskelzellen eine geringere SPHK1a-IR besitzen als die Zellen in den äußeren Schichten (→). Auch die kleineren Gefäße in der Umgebung (B, E: Doppelpfeil) weisen eine SPHK1a-IR der Tunica media auf (A, D: Doppelpfeil). Das Endothel lässt keine SPHK1a-IR erkennen (▶).

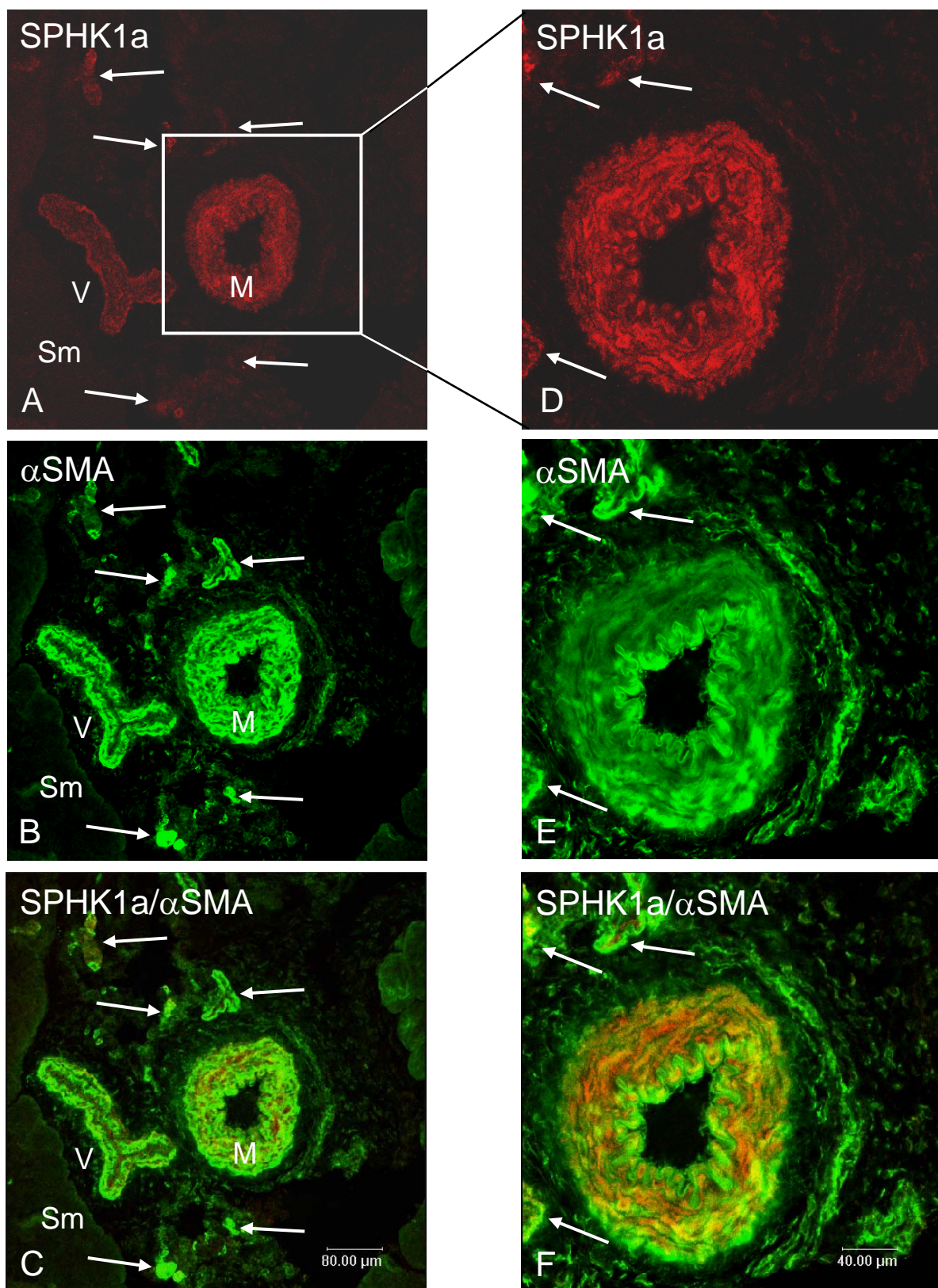


Abb. 23: A. femoralis

Die A. femoralis lässt eine sehr starke SPHK1a-IR der gesamten Tunica media (B, E: M) erkennen, es bestehen hier im Vergleich zu der Aorta abdominalis keine Intensitätsunterschiede zwischen den inneren und äußeren Muskelzellschichten (A, D: M). Die V. femoralis (V) weist wie die kleineren Gefäße (B: →) im Vergleich zu der rechts gelegenen Arterie bei gleichstarker αSMA-IR eine geringere SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen auf (A: →). Die angeschnittene Skelettmuskulatur (Sm) zeigt keine SPHK1a-IR.

Herz

Die Aorta thoracica und der Truncus pulmonalis (Abb. 24) wiesen eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen auf, die Zellen des Endothels waren nicht-reaktiv. Im Myokard konnte in den atrialen und ventrikulären Koronargefäßen eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen der Tunica media festgestellt werden, das Gefäßendothel hingegen zeigte keine SPHK1a-IR (Abb. 25-27). Die SPHK1a-IR der venösen Gefäßmedia war im Vergleich zu den Arterien schwächer ausgeprägt (Abb. 26). Die SPHK1a-IR der Koronargefäßmuskulatur nahm mit Verringerung des Gefäßdurchmessers stetig ab und verschwand bei den präkapillären Gefäßen mit nur noch einer Muskelzellschicht völlig (Abb. 26, 27). Weder atriale noch ventrikuläre Kapillaren zeigten SPHK1a-IR.

Das Epikard zeigte weder im Mesothel noch in den unterschiedlichen Strukturen der Lamina propria, wie den kollagenen Faserbündel oder den elastischen Netzen, eine SPHK1a-IR. Die Herzmuskulatur, sowohl die der Atrien als auch die der beiden Ventrikel, wies ebenfalls keine SPHK1a-IR auf. Das Endokard mit dem Stratum subendotheliale ließ keine SPHK1a-immunreaktive Zellen erkennen (Abb. 28). Das darauf folgende Stratum myoelasticum zeigte eine sehr starke SPHK1a-IR der zwischen den kollagenen und elastischen Fasern eingelagerten glatten Muskelzellen (Abb. 28). Die Bindegewebszellen der Tela subendocardialis, die das Endokard mit dem Endomysium verbindet, wiesen keine SPHK1a-IR auf. Die verschiedenen Strukturen der Atrioventrikular- und der Taschenklappen, durch eine Faserplatte gestützte Endothelfalten, zeigten keine SPHK1a-IR.

Weiterhin zeigten atriale Zellen mit glattem Muskelzellaktin keine SPHK1a-IR (Abb. 29). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um Zellen des Reizleitungssystems des Herzens (Fairfax und Doniach, 1976; Franco und Icardo, 2001).

Die erfassten neuronalen Strukturen des Herzens wie vegetative Ganglien und Nervenfasern wiesen keine SPHK1a-IR auf (Abb. 30).

Es konnten perivaskulär einige längliche, verstreut lokalisierte Zellen, die stark SPHK1a-immunreaktiv waren, sowohl in den Vorhöfen als auch in den Ventrikeln dargestellt werden (Abb. 28). Diese enthielten kein glattes Muskelzellaktin. Es könnte sich hierbei um Zellen des immunologischen Systems handeln.

Bei der Untersuchung des mit Isopropanol-fixiertem Atriums zeigte die Aorta thoracica eine sehr starke SPHK1a-IR der äußeren glatten Muskelzellen der Tunica media, die nach luminal hin stark abnahm. Bei der mit Aceton fixierten Aorta war dieses Muster jedoch nicht so

deutlich ausgeprägt. Die glatten Muskelzellen des Truncus pulmonalis ließen fixierungsunabhängig in der gesamten Tunica media eine gleichmäßig starke Fluoreszenz erkennen (Abb. 24).

Die immunhistochemische Untersuchung des Ventrikels zeigte hinsichtlich der SPHK1a-IR des Gewebes keine fixationsabhängigen Unterschiede.

Tab. 6: SPHK1a-IR des Herzens

	SPHK1a-IR		Anmerkungen
Koronargefäße ²	Endothel	Tunica media	² atriale und ventrikuläre
▪ Arterien	-	++	
▪ Venen	-	+	
Aorta thoracica (A) ³	-	+++	³ Aceton-Fixierung
Aorta thoracica (I) ⁴	-	+++ ⁵	⁴ Isopropanol-Fixierung
Truncus pulmonalis	-	+++	⁵ nach luminal hin abnehmend
Herzmuskulatur			
▪ Atrium	-		
▪ Ventrikel	-		
▪ Reizleitungssystem	-		
Wandschichten			
▪ Endokard	+++ ⁶		⁶ glatte Muskelzellen
▪ Myokard (s.o.)	+++ ⁷		⁷ vereinzelte längliche Zellen
▪ Epikard	-		
Neuronale Strukturen			
Ganglien	-		
Nervenfasern	-		

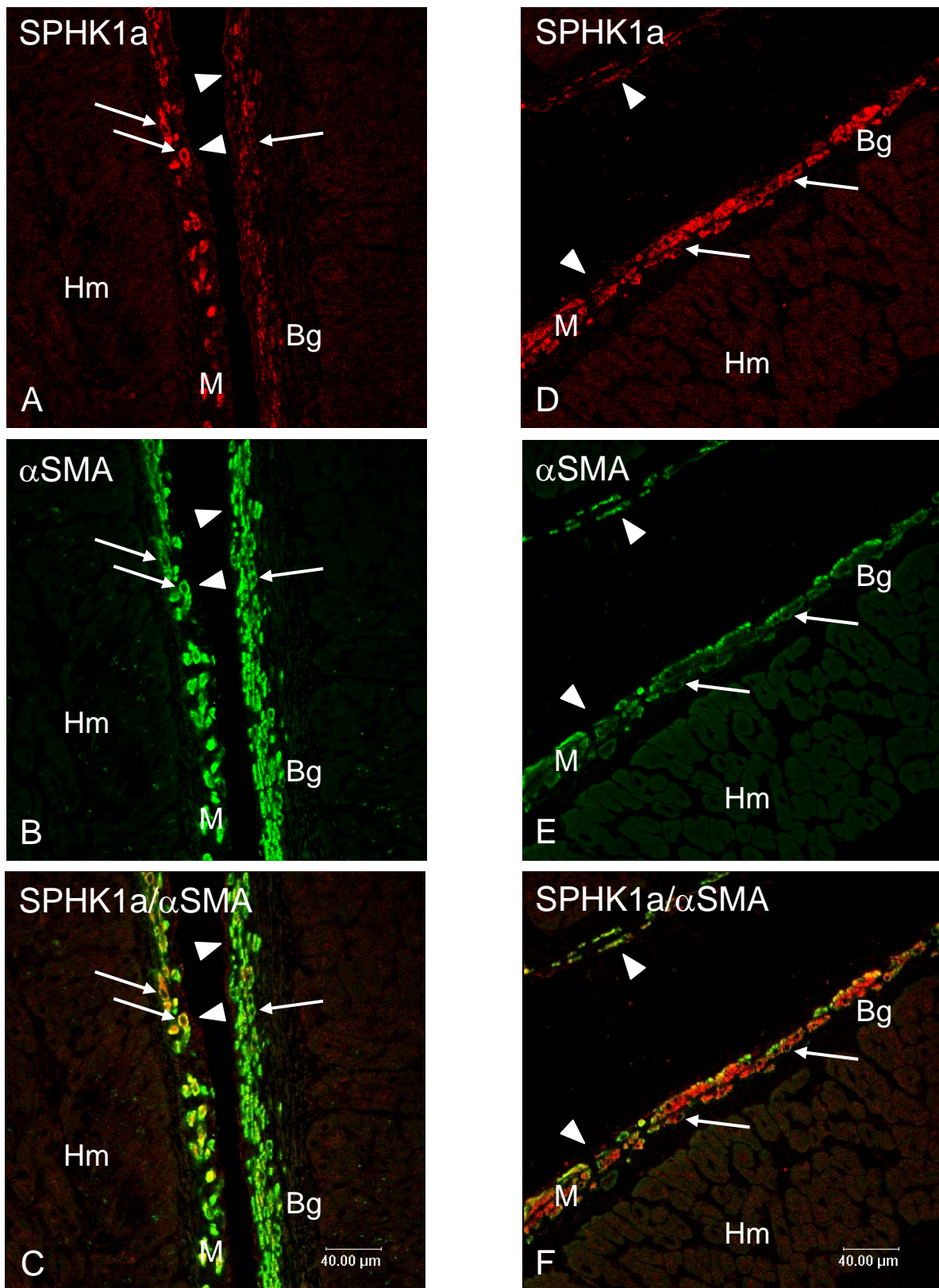


Abb. 24: Atrium, Truncus pulmonalis

Die Tunica media des Truncus pulmonalis (B, E: M) zeigt eine sehr starke SPHK1a-IR aller glatten Muskelzellen (A, D: M). Durch die nicht-reaktiven Zellkerne sind einzelne glatte Muskelzellen (\rightarrow) in der Tunica media gut abgrenzbar. Das Endothel (\blacktriangleright) zeigt wie das umgebende Bindegewebe (Bg) keine SPHK1a-IR der verschiedenen Zellpopulationen und -strukturen auf. Die atriale Herzmuskulatur (Hm) lässt nur eine Autofluoreszenz und keine spezifische IR erkennen.

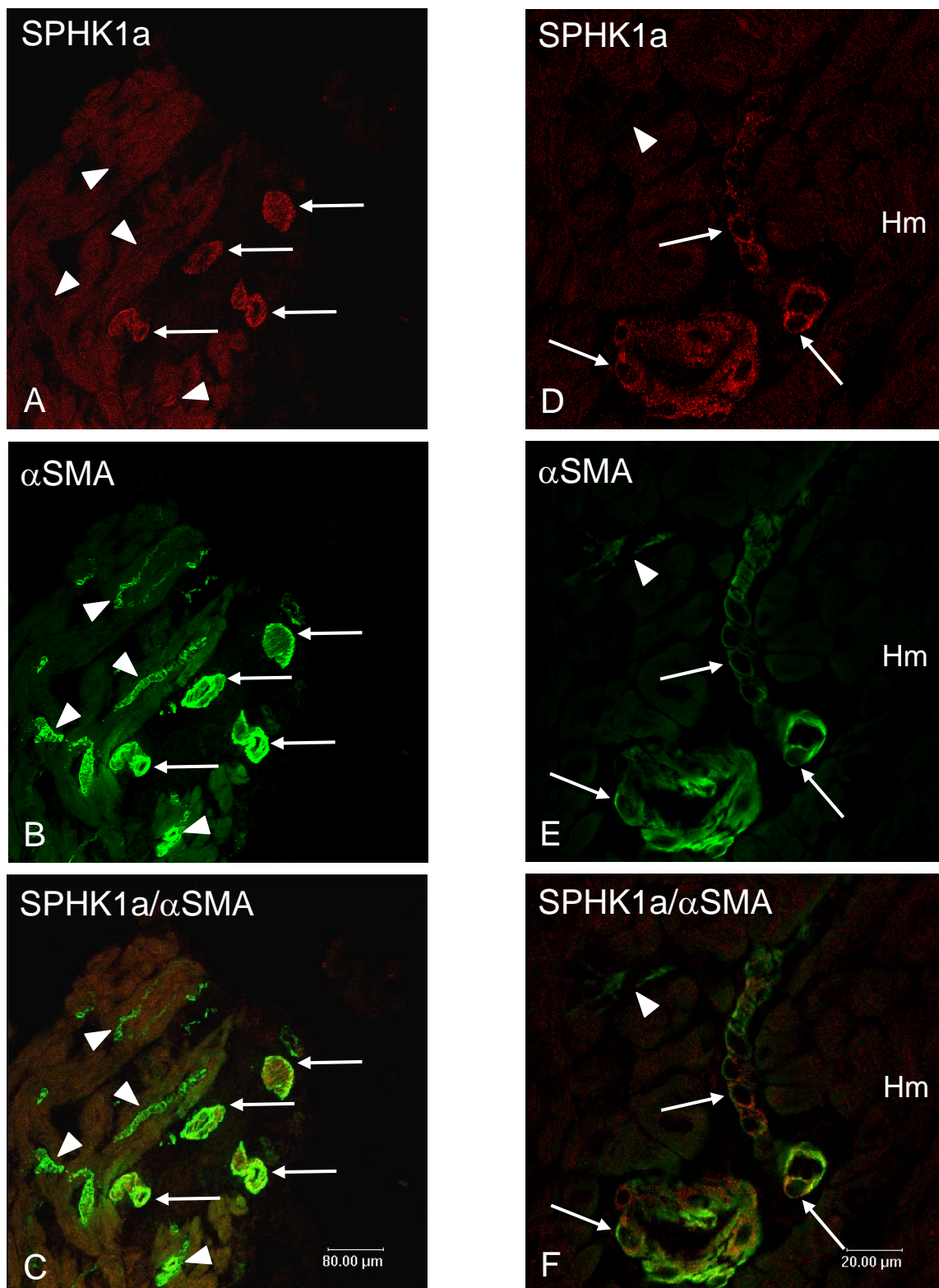


Abb. 25: Atrium, Koronargefäße

Die glatten Gefäßmuskelzellen der Koronargefäße (B, E: →) weisen eine starke SPHK1a-IR des Zytoplasmas auf (A, D: →), die Nuklei sind nicht-reaktiv. In den hohen Vergrößerungen (D-F) zeigt sich deutlich die Kolokalisation des αSMA und der SPHK1a im Zytoplasma. Bei den glatten Muskelzellen der kleineren Koronargefäße (B, E: ►) hingegen ist keine SPHK1a-IR zu erkennen (A, D: ►). Das umgebende Herzmuskelgewebe (Hm) weist keine SPHK1a-IR auf.

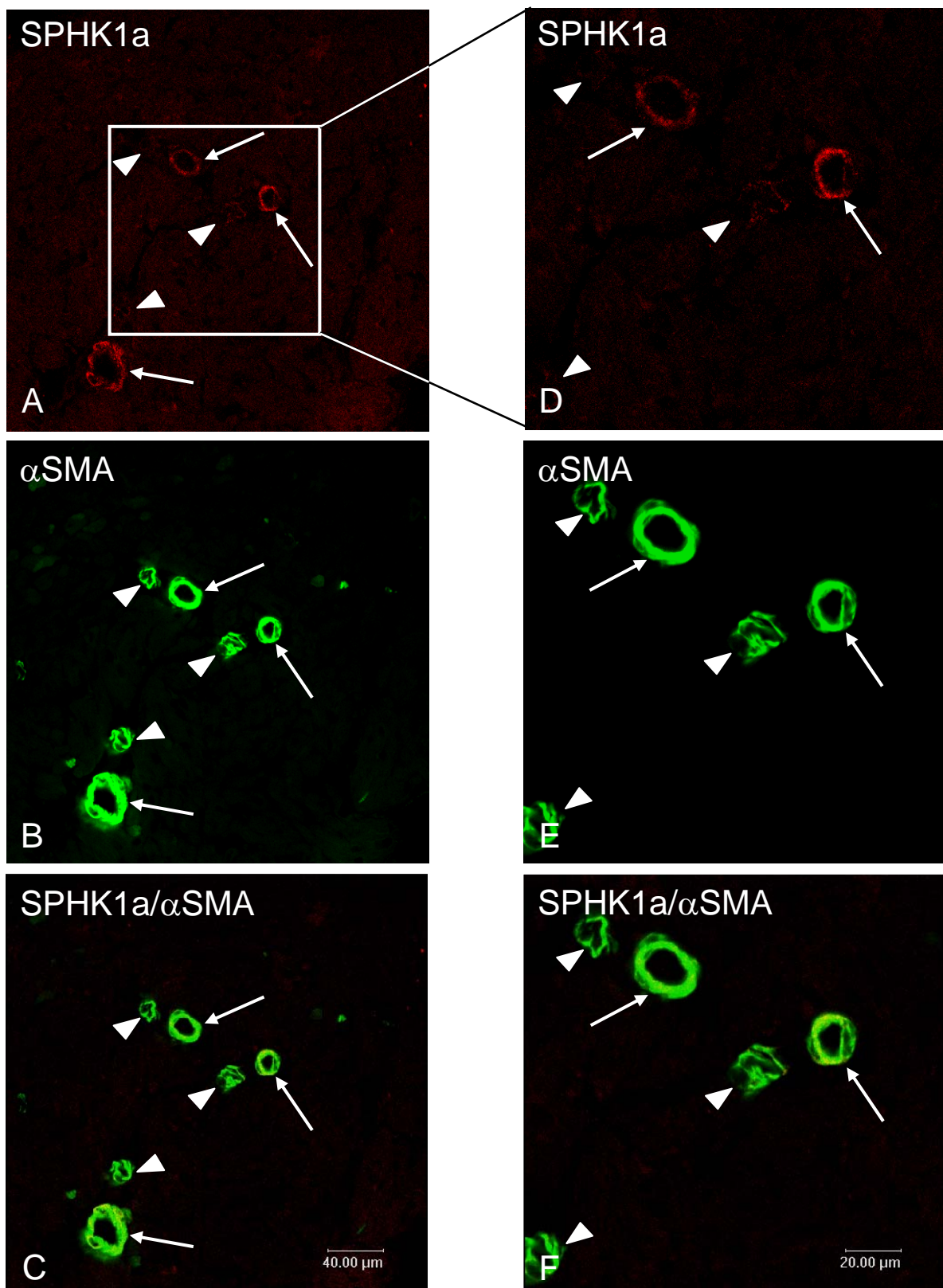


Abb. 26: Atrium, Koronararterien und –venen im Vergleich

Die in dem schwach autofluoreszenten Herzmuskelgewebe gelegenen Koronargefäße zeigen eine SPHK1a-IR der Tunica media. Die Arterien (B, E: →) und die parallel verlaufenden Venen (B, E: ▶) zeigen keinen Unterschied in der αSMA-IR ihrer glatten Muskelzellen. Die SPHK1a-IR ist jedoch bei der Tunica media der Arterien (A, D: →) stärker als bei den dazugehörigen Venen (A, D: ▶). Das Endothel ist wie das umgebende Bindegewebe bei allen Koronargefäßen nicht markiert.

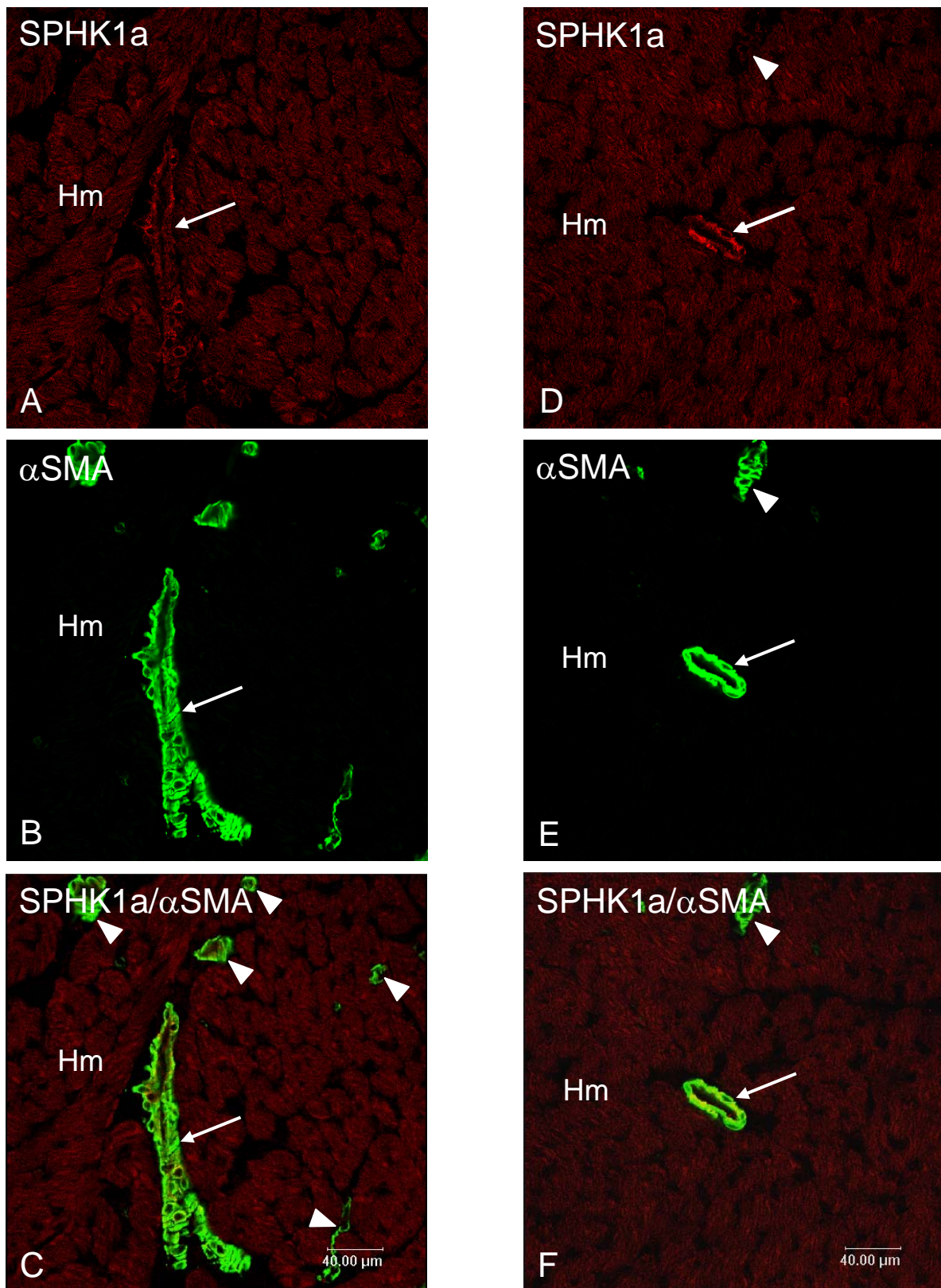


Abb. 27: Ventrikel, Koronargefäße

Die SPHK1a-IR der Tunica media ist abhängig von der Gefäßgröße: Die größeren Koronargefäße (B, E: →) zeigen eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A, D: →), während bei kleineren Gefäßdurchmessern (B, D: ►) die SPHK1a-IR der Tunica media (A, D: ►) nicht die Autofluoreszenz der umgebenden Herzmuskulatur (Hm) übersteigt. Diese kleinen Koronargefäße können nur durch die αSMA-IR abgegrenzt werden.

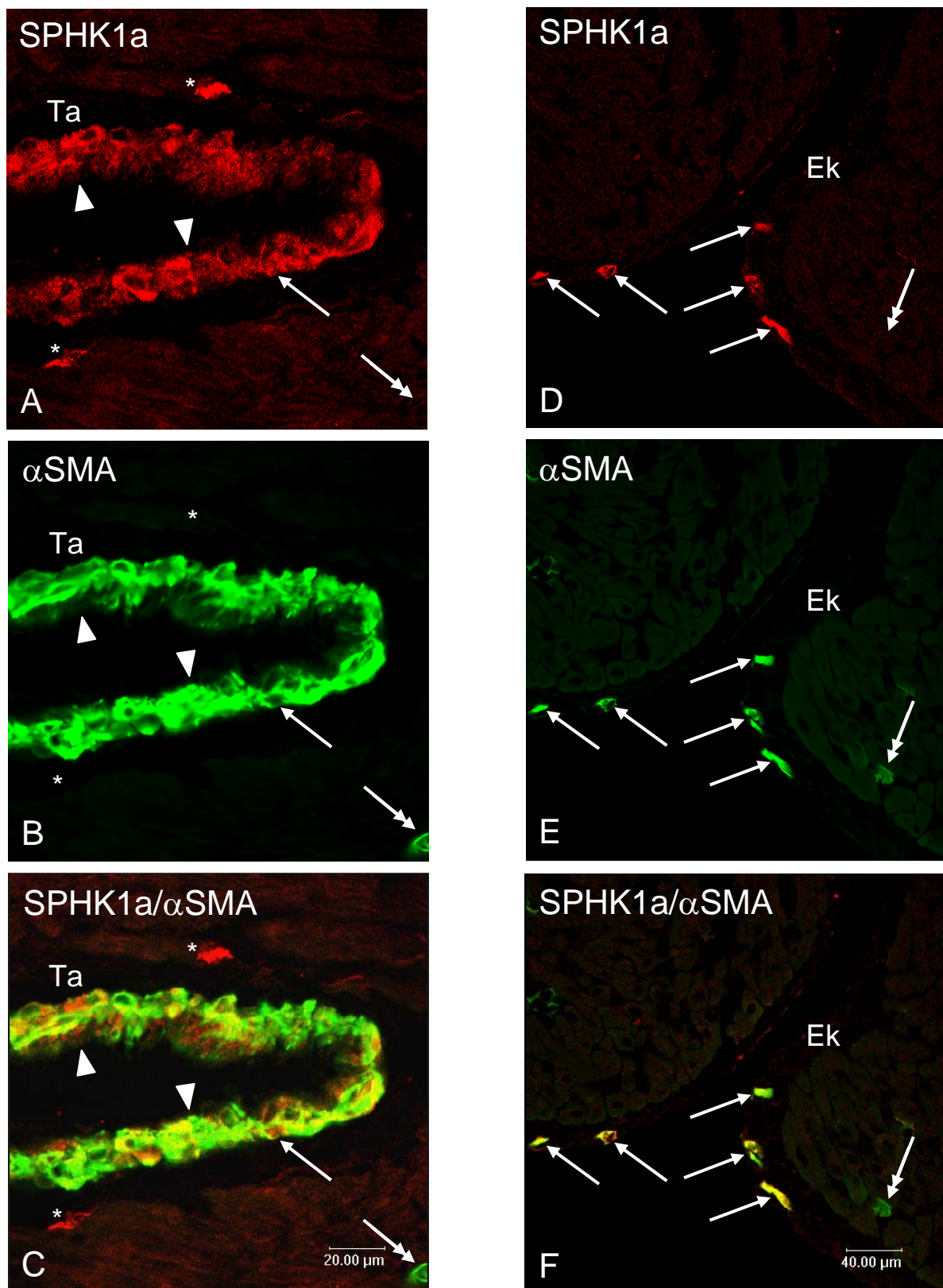


Abb. 28: Atrium, perivaskuläre SPHK1a-immunreaktive Zellen, Endokard

Die Tunica media der größeren Koronargefäße (B: →) zeigt eine starke SPHK1a-IR (A: →), das Endothel (▶) und die Tunica adventitia (Ta) stellen sich nicht dar. Perivaskulär sind einzelne längliche Zellen mit sehr starker SPHK1a-IR abgrenzbar (A-C: *). Im Stratum myoelasticum gelegene glatte Muskelzellen (E: →) weisen eine sehr starke SPHK1a-IR auf (D: →). Die weiteren Schichten des Endokards (Ek) zeigen keine SPHK1a-IR der verschiedenen Zellpopulationen oder Strukturen. Die kleinen Koronargefäße (B, E: Doppelpfeil) im Myokard lassen keine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen erkennen (A, D: Doppelpfeil).

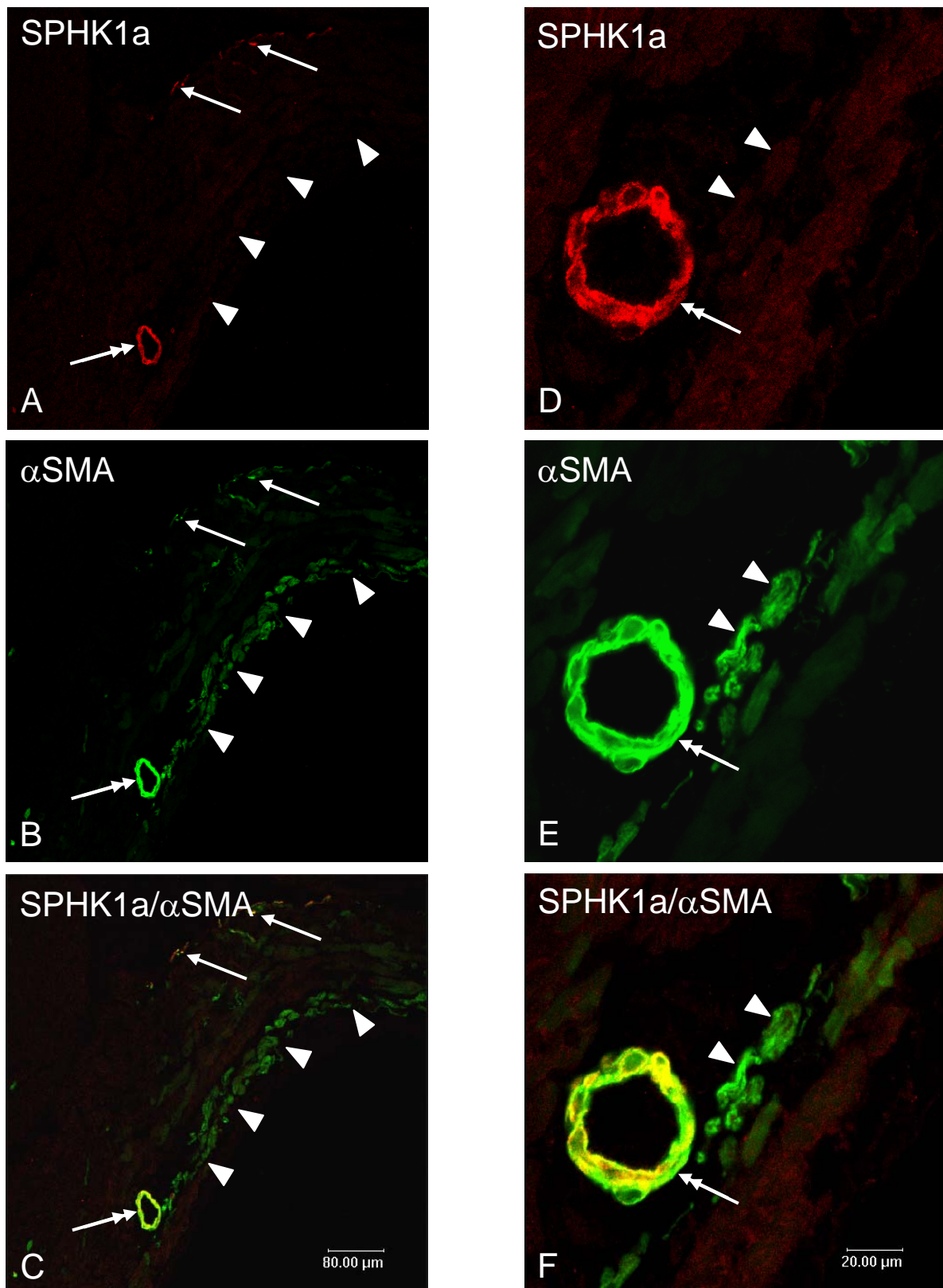


Abb. 29: Atrium, Reizleitungssystem

Die Tunica media der Koronargefäße (B, E: Doppelpfeil) zeigt eine starke SPHK1a-IR aller glatten Muskelzellen (A, D: Doppelpfeil). Auch die glatten Muskelzellen des Endokards (B, E: →) lassen eine starke SPHK1a-IR erkennen (A, D: →). Das Reizleitungssystem des Herzen weist keine SPHK1a- (A, D: ►), aber eine αSMA-IR (B, E: ►) auf.

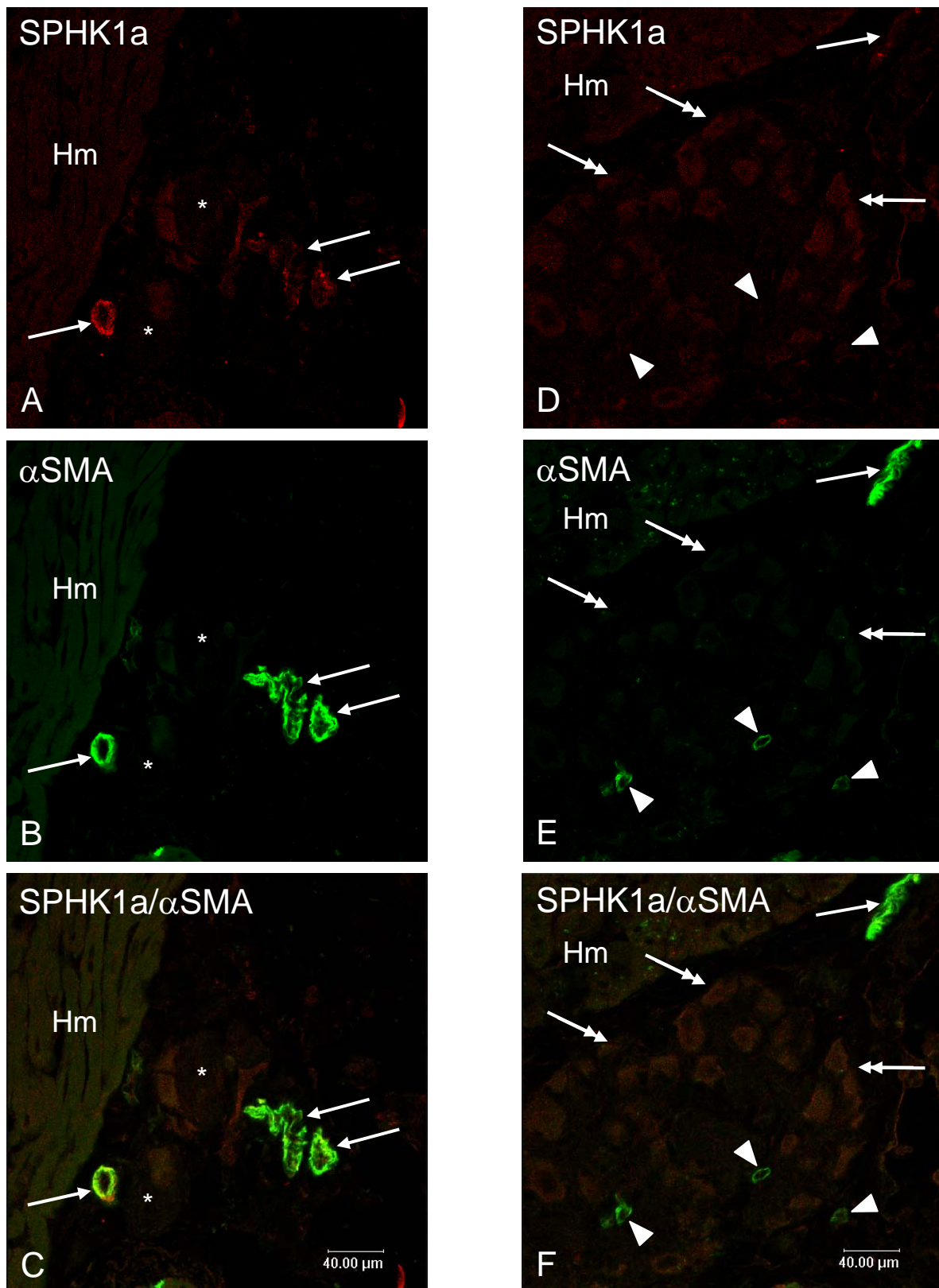


Abb. 30: Atrium, Nervenfasern und Ganglion
Neben der autofluoreszenten Herzmuskulatur (H) stellen sich hier Gefäße (B, E: →), u. a. Vasa nervorum, mit SPHK1a-IR der Tunica media dar (A, D: →). Die im perikardialen Bindegewebe gelegenen Nervenfasern (*) zeigen keine SPHK1a-IR. Auch die kardialen Ganglienzellen (Doppelpfeil) lassen keine SPHK1a-IR erkennen. Die intragangliären Vasa nervorum (B, E: ►) weisen im Gegensatz zu den periganglionären Gefäßen keine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen auf (A, D: ►).

Unterer Respirationstrakt

Trachea

Die Blutgefäße zeigten abhängig vom Durchmesser keine bis eine starke SPHK1a-IR der Tunica media, das Endothel war nicht-reaktiv (Abb. 31). Die Gefäße der Tunica adventitia stellten sich mit stärkerer SPHK1a-IR dar als die Arterien und Venen der Lamina propria. Insgesamt war die SPHK1a-IR der glatten Gefäßmuskelzellen verglichen mit anderen Geweben in der Trachea schwächer ausgebildet. Das respiratorische Epithel der Trachea wies keine SPHK1a-IR auf. Zwischen den nicht-reaktiven Epithelzellen der seromukösen Glandulae tracheales wiesen vereinzelte Zellen eine starke SPHK1a-IR auf (Abb. 32). Bei den die Drüsen umgebenden Myoepithelzellen konnte eine geringe SPHK1a-IR festgestellt werden. In der Tunica fibromusculocartilaginea zeigte die glatte Muskulatur des M. trachealis eine sehr starke SPHK1a-IR (Abb. 31). Die Cartilagine tracheales und die aus Kollagen und elastischen Fasern bestehenden Bindegewebszüge wiesen keine spezifische IR auf.

Bei den angeschnittenen Nervenfasern des N. vagus konnte keine SPHK1a-IR festgestellt werden.

Tab. 7: SPHK1a-IR der Trachea

Gefäße	SPHK1a-IR		Anmerkungen
	Endothel	Tunica media	
▪ Lamina propria	-	-/++	
▪ Tunica adventitia	-	++	
Wandschichten			
Respiratorisches Epithel	-		
Glandulae tracheales	+ ⁸		⁸ vereinzelte Epithelzellen
Myoepithelzellen	+		
M. trachealis	+++		
Neuronale Strukturen			
Nervenfasern	-		

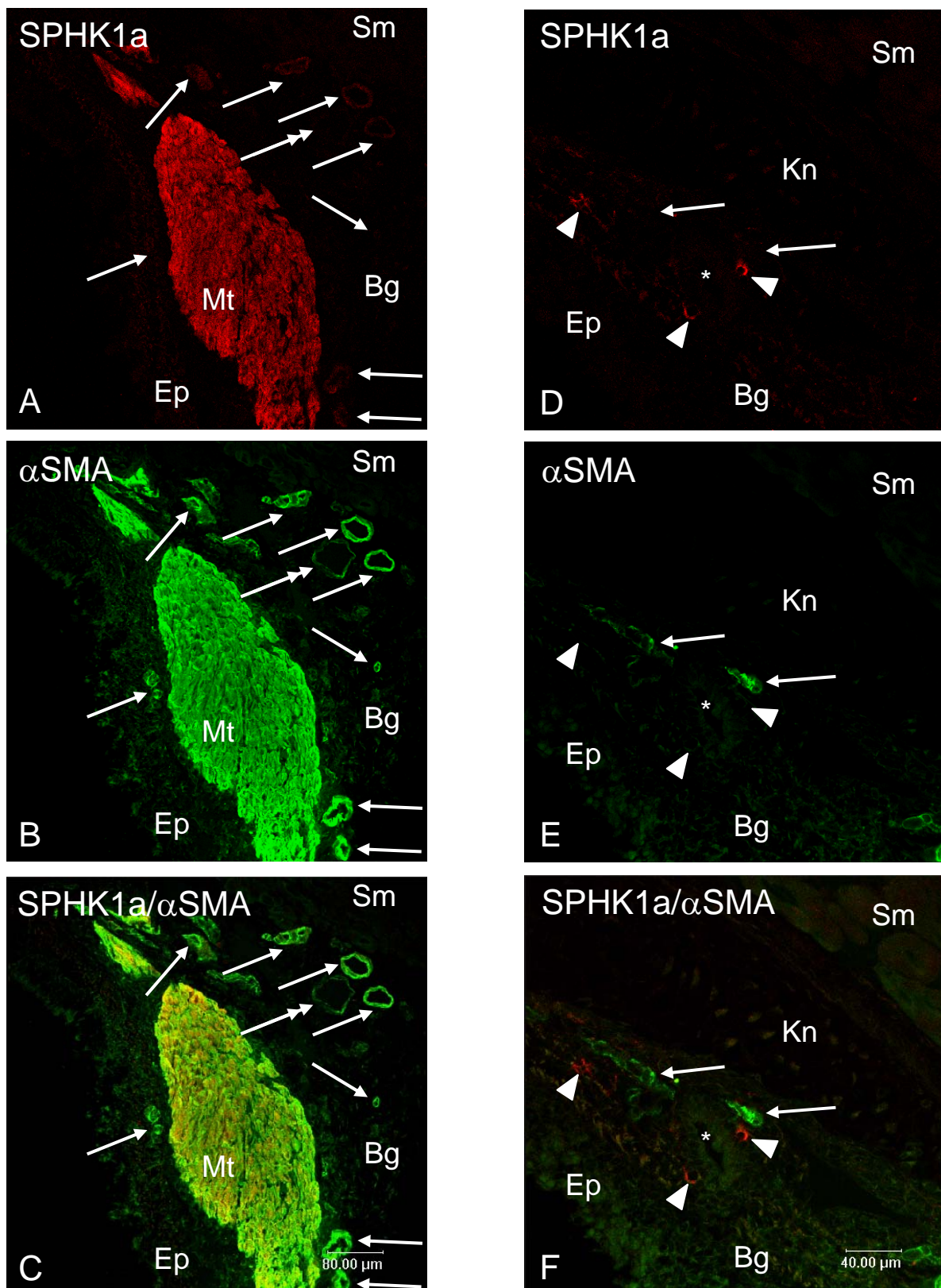


Abb. 31: Trachea, Blutgefäße

Die Tunica media der Arterien (→) zeigt eine stärkere SPHK1a-IR (A, D:→) als die der dazugehörigen Vene (Doppelpfeil). Die Arterien weisen eine unterschiedliche IR der glatten Muskelzellen in Abhängigkeit ihrer Größe auf. Der M. trachealis (Mt) zeigt eine sehr starke SPHK1a-IR (A: Mt). Einzelne Epithelzellen der Glandulae tracheales (*) weisen eine starke SPHK1a-IR des Zytoplasmas auf (D: ►). Das respiratorische Epithel (Ep) der Trachea, das umgebende Bindegewebe (Bg), der hyaline Knorpel der Tunica fibromusculocartilaginea (Kn) und auch die Skelettmuskulatur des dorsal gelegenen Ösophagus (Sm) lassen keine SPHK1a-IR erkennen.

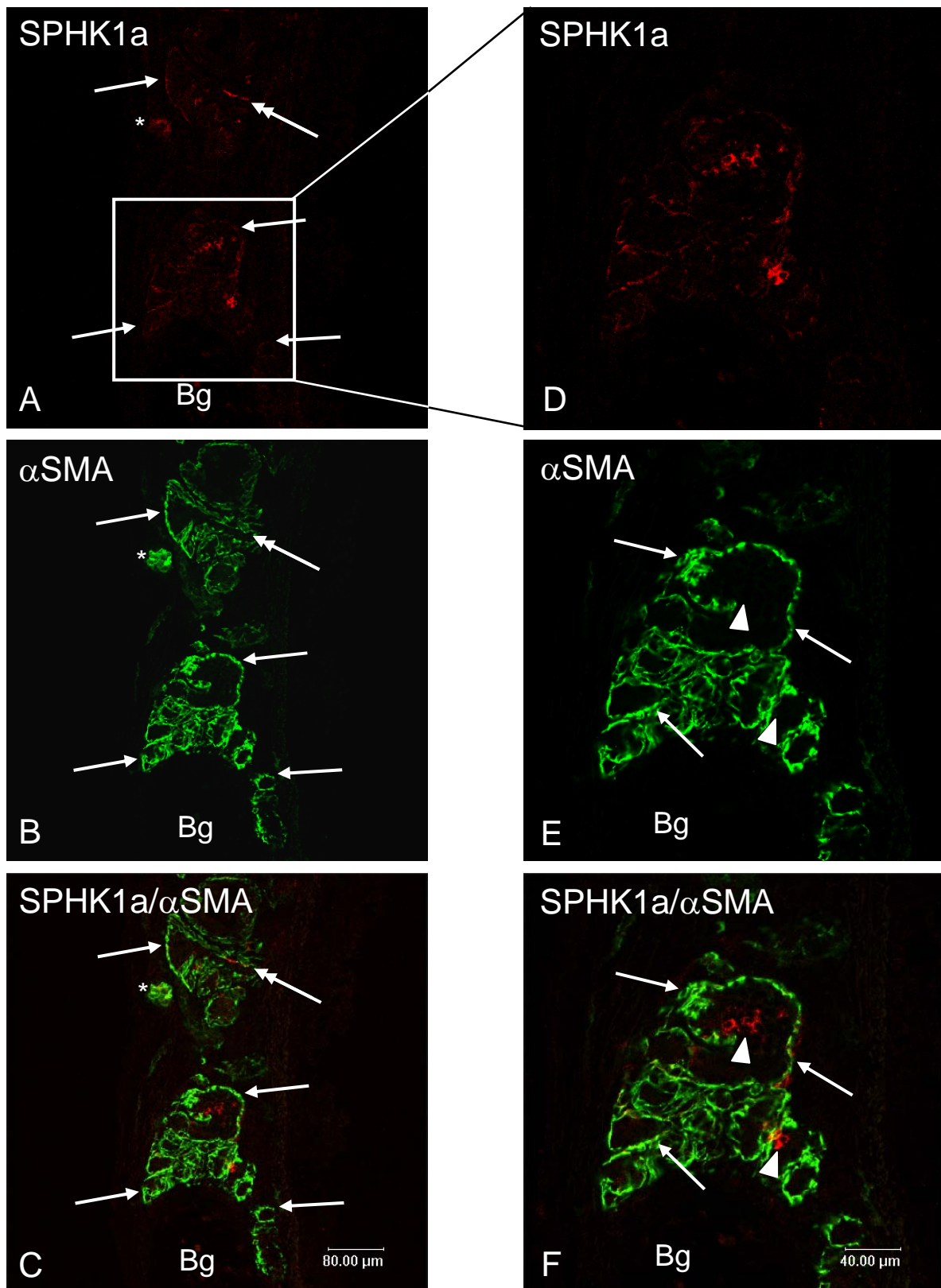


Abb. 32: Trachea, Glandulae tracheales

Zwischen den nicht-reaktiven Epithelzellen der Glandulae tracheales sind einzelne Zellen (A, D: ►) und Strukturen (Doppelpfeil) abgrenzbar, die eine starke SPHK1a-IR besitzen, aber keine αSMA-IR (B, E: ►). Die die seromukösen Drüsen umgebenden Myoepithelzellen (B, E: →) weisen eine geringe SPHK1a-IR auf (A, D: →). Das kleine Blutgefäß (B: *) zeigt eine geringe SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A: *). Das Bindegewebe (Bg) lässt keine spezifische IR erkennen.

Lunge

Die Bronchien zeigten in ihrem ganzen Verlauf eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskulatur (Abb. 33). Die SPHK1a-IR der glatten Bronchialmuskulatur konnte von den Hauptbronchien über die Bronchioli terminalis und respiratorii bis hin in die Ducuts alveolares nachgewiesen werden (Abb. 34). Das respiratorische Epithel und das Bindegewebe der Lamina propria wiesen keine SPHK1a-IR auf. Der in der Tunica fibromusculocartilaginea gelegene hyaline Knorpel ließ keine SPHK1a-IR der Zellen oder Strukturen erkennen. Die Alveolarsepten mit Pneumozyten Typ I und II, Endothelzellen der Alveolenkapillaren und Basallaminae zeigten keine SPHK1a-IR (Abb. 33).

Bei den Bronchien begleitenden Vasa publica und den nutritiven Vasa privata konnte eine starke SPHK1a-IR der Gefäßmedia beobachtet werden, deren Intensität jedoch weit geringer war als die der Bronchialmuskulatur (Abb. 35). Die Vv. pulmonales wiesen eine starke SPHK1a-IR der inneren glatten Muskelzellschicht auf, die außen angrenzende Herzmuskulatur zeigte keine SPHK1a-IR (Abb. 34). Beim Endothel konnte keine SPHK1a-IR festgestellt werden. Die angeschnittenen pulmonalen Lymphknoten wiesen in keinem Bereich eine SPHK1a-IR auf.

Zufällig angeschnittene Nervenfasern im Bereich der Bronchi principales und lobares zeigten keine spezifische IR.

Die Untersuchung des Lungengewebes zeigte eine fixierungsunabhängige Darstellung der unterschiedlichen Strukturen und Zellpopulationen in Lokalisation und Intensität der SPHK1a-IR.

Tab. 8: SPHK1a-IR der Lunge

	SPHK1a-IR	
Gefäße	Endothel	Tunica media
Vasa publica	-	++
Vasa privata	-	++
Vv. pulmonales	-	++
Bronchien		
Respiratorisches Epithel	-	
Glatte Muskulatur	+++	

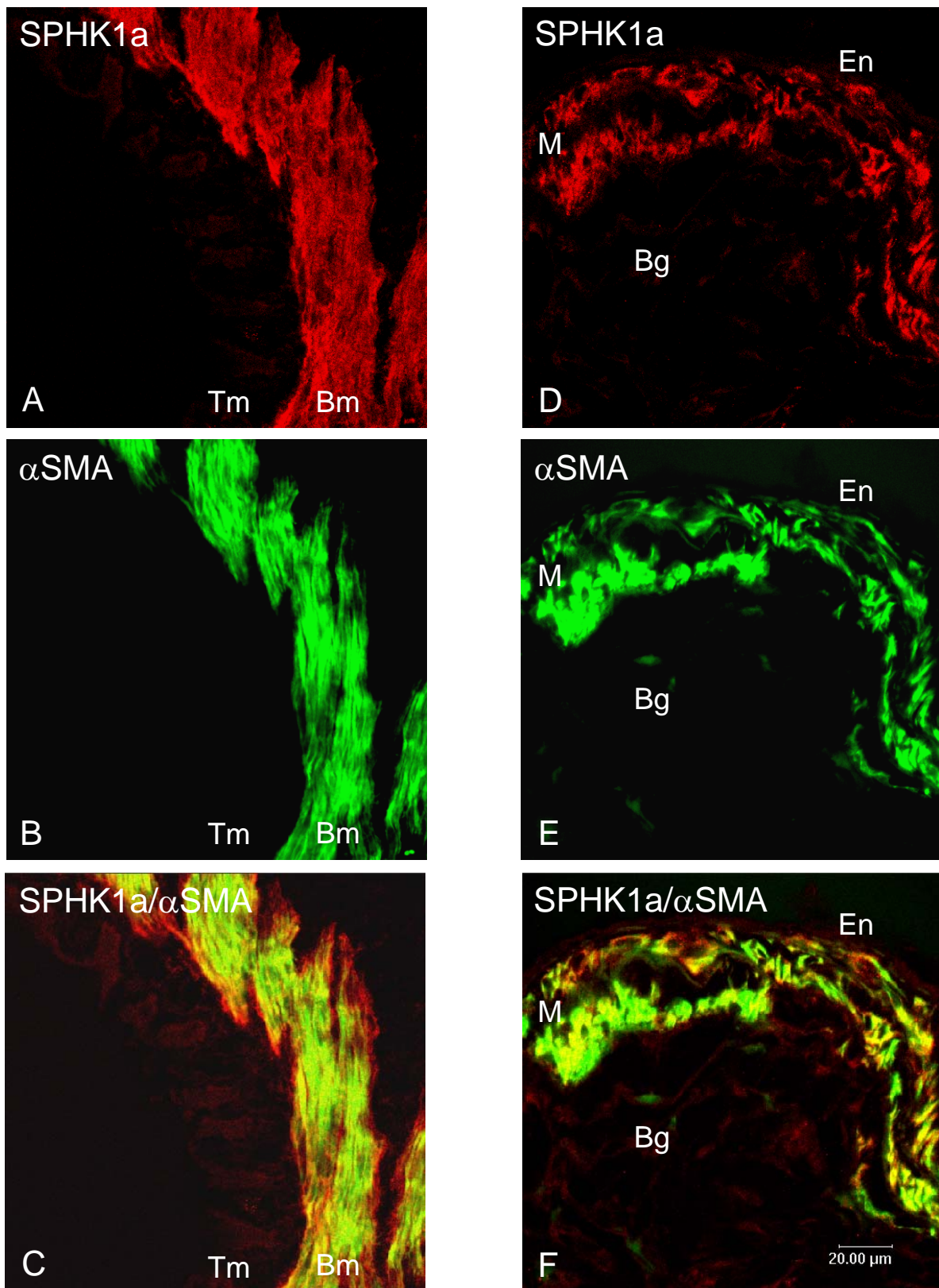


Abb. 33: Lunge, Bronchus lobaris (A-C), A. pulmonalis (D-F)

Der Bronchus lobaris zeigt keine SPHK1a-IR der Tunica mucosa (Tm): die unterschiedlichen Zellen und Strukturen des respiratorischen Epithels und des Bindegewebes sind nicht-reaktiv. Die darauf folgende Tunica fibromusculocartilaginea weist eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Bronchialmuskulatur (B: Bm) auf (A: Bm). Bei der A. pulmonalis lässt sich neben dem nicht-reaktiven Endothel (En) eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Gefäßmuskulatur in der Tunica media (E: M) erkennen (D: M). Das Bindegewebe (Bg) der Tunica adventitia zeigt keine SPHK1a-IR.

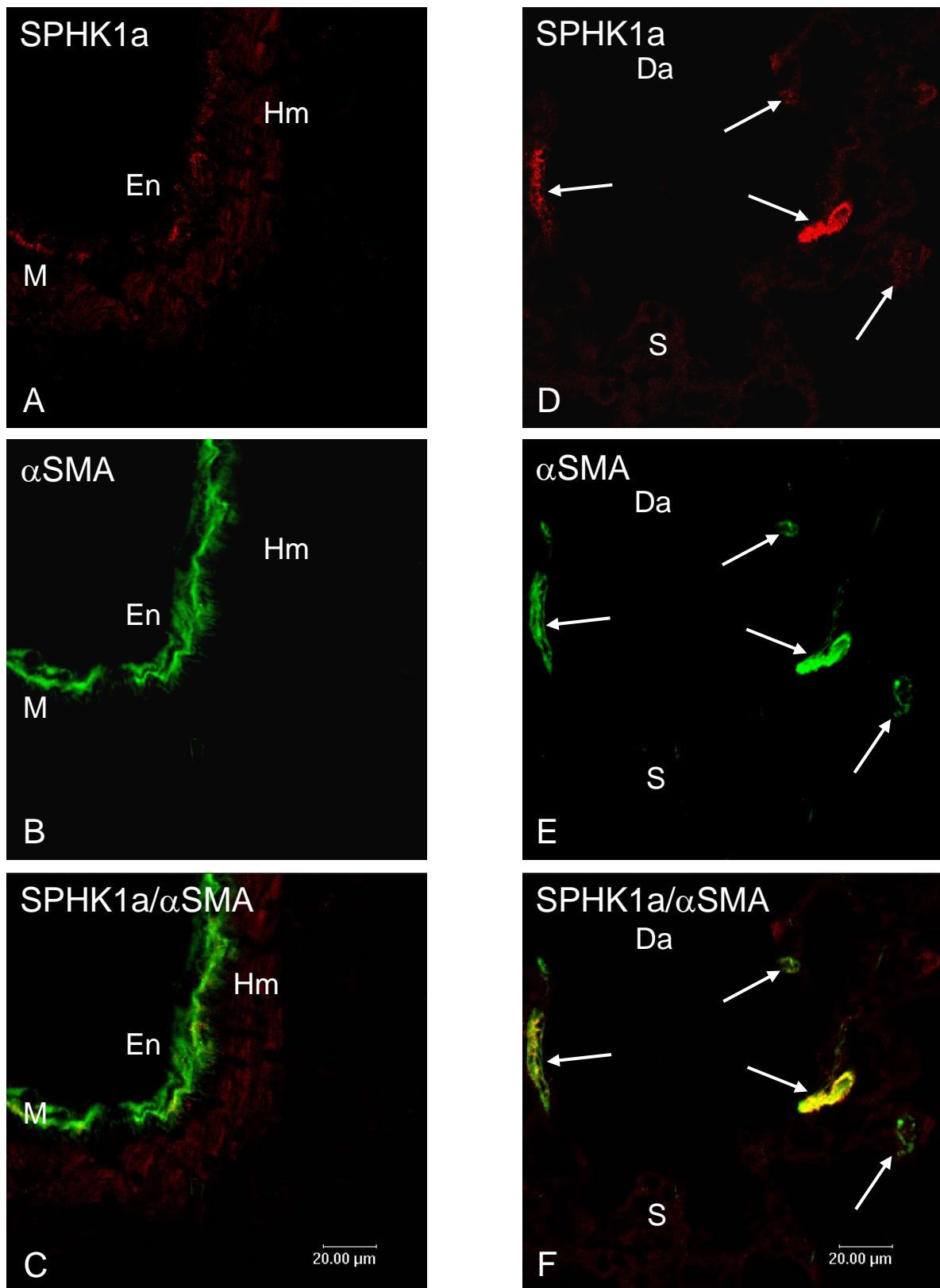


Abb. 34: Lunge, V. pulmonalis (A-C), Ductus alveolares (D-F)

Die Tunica media (C: M) zeigt eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (B: M), die weiter außen gelegene Herzmuskulatur (Hm) hingegen weist nur eine Autofluoreszenz auf. Das Endothel (En) der V. pulmonalis zeigt keine SPHK1a-IR. Die glatten Muskelzellen (E: →) der Ductus alveolares (Da) zeigen eine sehr starke SPHK1a-IR (D: →). Die verschiedenen Zellpopulationen der Alveolarsepten (S) weisen keine SPHK1a-IR auf.

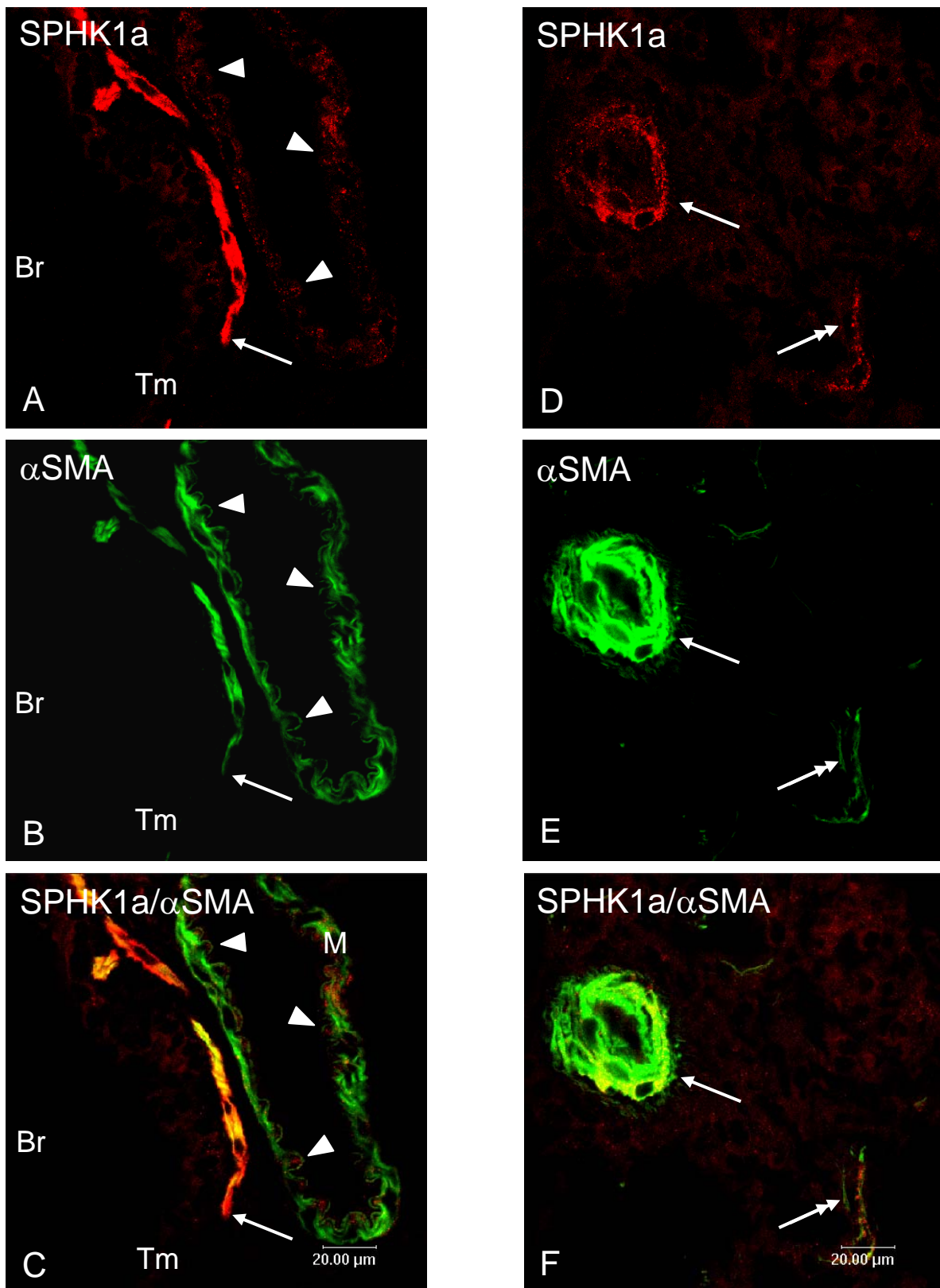


Abb. 35: Lunge, Vasa publica und privata

Der Bronchus (Br) zeigt eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (B: →). Die Tunica mucosa (Tm) weist keine IR auf. Das Endothel (▶) der A. pulmonalis lässt keine SPHK1a-IR erkennen. Die glatten Muskelzellen der Tunica media (M) zeigen eine starke SPHK1a-IR, die jedoch deutlich geringer ist als die der Bronchialmuskulatur. Die A. bronchialis weist eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (E: →) auf (D: →). Die im umgebenden Lungengewebe gelegenen glatten Muskelzellen (E: Doppelpfeil) zeigen eine starke SPHK1a-IR (D: Doppelpfeil).

Gastrointestinaltrakt

Zunge

Die Zunge wies keine SPHK1a-IR der verschiedenen Zellpopulationen der Tunica mucosa mit autofluoreszenten Papillen und Lamina propria auf (Abb. 36). Die sich kreuzenden Faserbündel der quergestreiften Muskulatur und das umgebende Perimysium zeigten keine SPHK1a-IR. Die Drüsenzellen der seromukösen Glandulae linguales wiesen keine SPHK1a-IR auf (Abb. 37). Die Myoepithelzellen zeigten eine unterschiedliche SPHK1a-IR: Die meisten dieser kontraktilen Zellen wiesen eine geringe SPHK1a-IR auf, jedoch gab es einzelne Drüsenpakete, deren zugehörige Myoepithelzellen nicht-reaktiv waren (Abb. 37). Die angeschnittenen Drüsenausführungsgänge ließen keine SPHK1a-IR der Epithel- oder Bindegewebszellen erkennen (Abb. 38). Die glatten Muskelzellen der Arterien und auch der Venen stellten sich mit einer sehr starken SPHK1a-IR dar, das Endothel war nicht-reaktiv (Abb. 36). Bei einigen kleinen v. a. subepithelial gelegenen Blutgefäßen konnte jedoch keine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen festgestellt werden (Abb. 36). Die Nervenfasern des N. lingualis und die parasympathischen Ganglien zeigten keine SPHK1a-IR (Abb. 38).

Bei den Untersuchungen der Zunge konnte ein fixierungsabhängiger Unterschied der SPHK1a-IR der Gefäßmuskulatur festgestellt werden: Das Isopropanol-fixierte Gewebe zeigte eine höhere Anzahl von subepithelialen Blutgefäßen ohne SPHK1a-IR im Vergleich zum Aceton-fixierten.

Tab. 9: SPHK1a-IR der Zunge

	SPHK1a-IR		Anmerkungen
Gefäße	Endothel	Tunica media	
▪ Arterien	-	+++/- ⁹	⁹ fixierungsabhängig bei den subepithelialen Gefäßen
▪ Venen	-	+++/- ⁹	
Speicheldrüsen			
Glandulae lingualis			
Myoepithelzellen	+/-		
Neuronale Strukturen			
Ganglien/Nervenfasern	-		
Skelettmuskulatur	-		

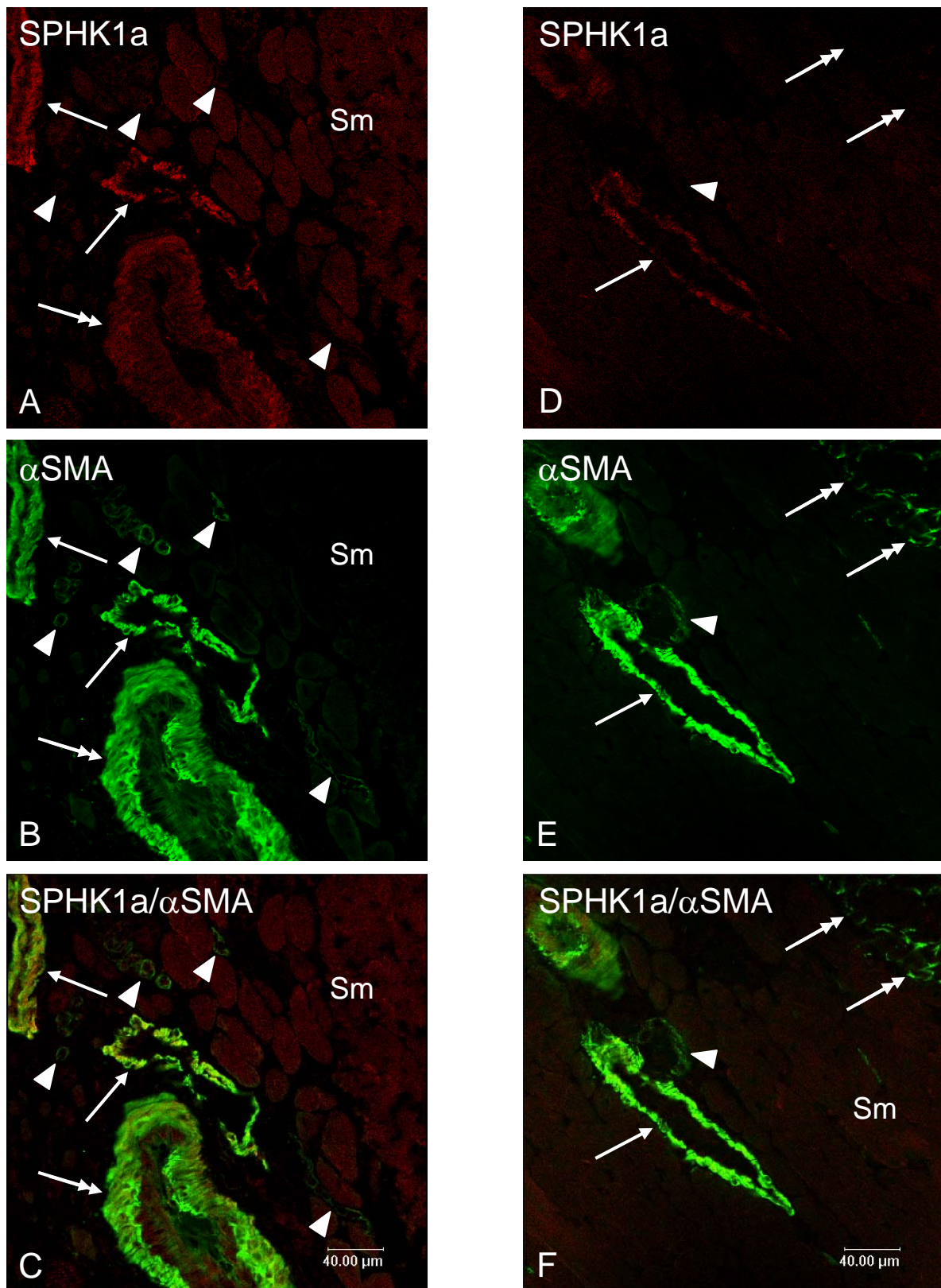


Abb. 36: Zunge, Blutgefäße und Zungenmuskulatur

Die A. lingualis (B: Doppelpfeil) zeigt eine starke SPHK1a-IR der Gefäßmuskulatur (A: Doppelpfeil). Die Blutgefäße kleineren Durchmessers (B: →) weisen im Vergleich zu der A. lingualis eine wesentlich stärkere IR der glatten Muskelzellen auf (A: →), während bei den präkapillären Gefäßen (B: ►) keine SPHK1a-IR erkennbar ist (A: ►). Das Gefäß (E: →) weist eine starke IR der Muskelzellen auf (D: →), hingegen zeigt der daraus entspringende Gefäßast (E: ►) keine SPHK1a-IR der Tunica media (D: ►). Neben der nicht-reaktiven Skelettmuskulatur (Sm) sind auch Myoepithelzellen (E: Doppelpfeil) zu erkennen, die keine SPHK1a-IR zeigen (D: Doppelpfeil).

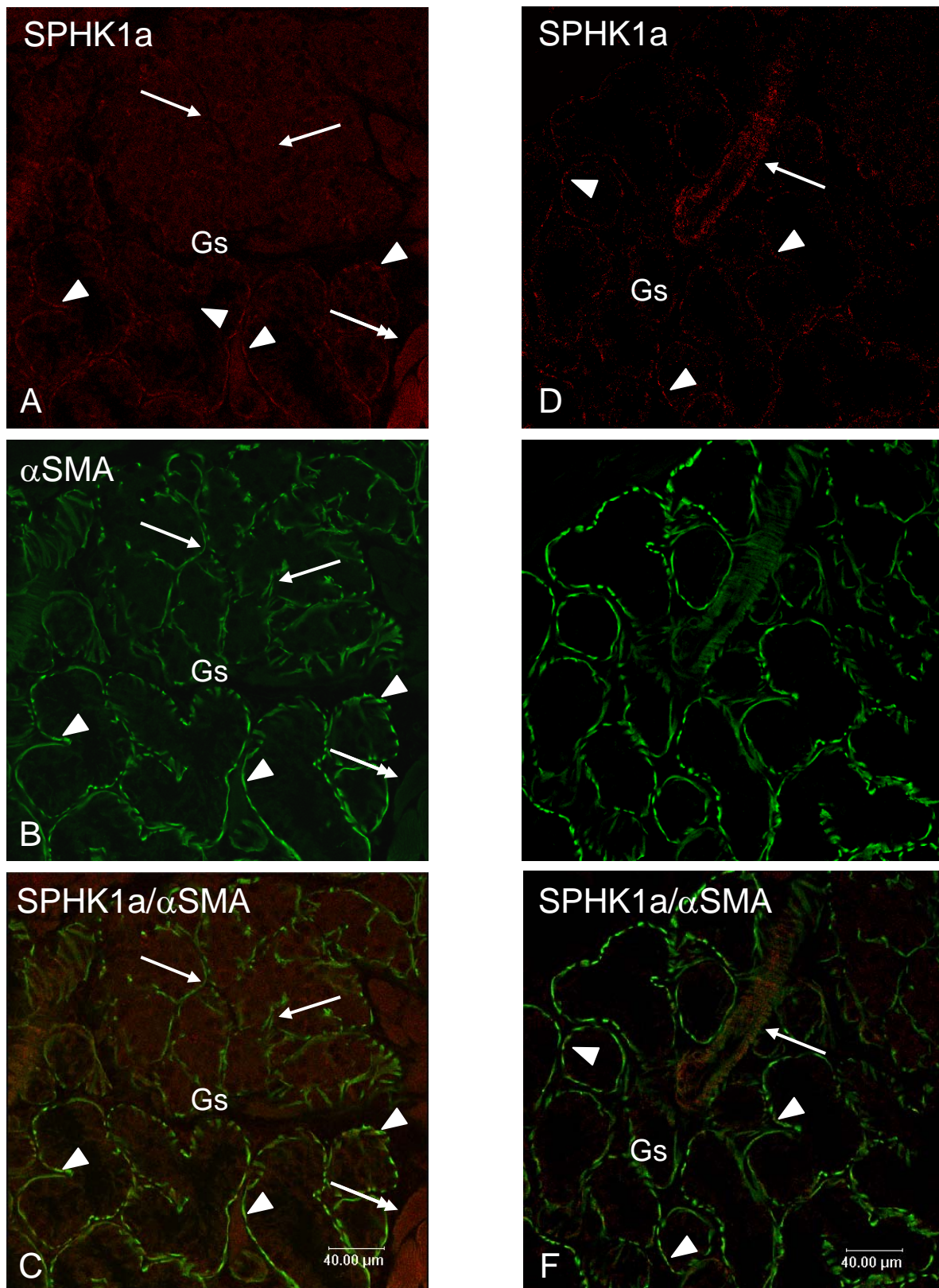


Abb. 37: Zunge, Glandula lingualis

Die Epithelzellen der Glandula lingualis (Gs) weisen keine SPHK1a-IR auf. Die umgebenden Myoepithelzellen (B, E: →, ►) zeigen zumeist eine geringe SPHK1a-IR (A, D: ►), es sind aber auch einzelne Drüsenpakete mit nicht-reaktiven Myoepithelzellen abgrenzbar (A, D: →). Die Tunica media des Blutgefäßes (E: →) lässt eine starke SPHK1a-IR erkennen (D: →).

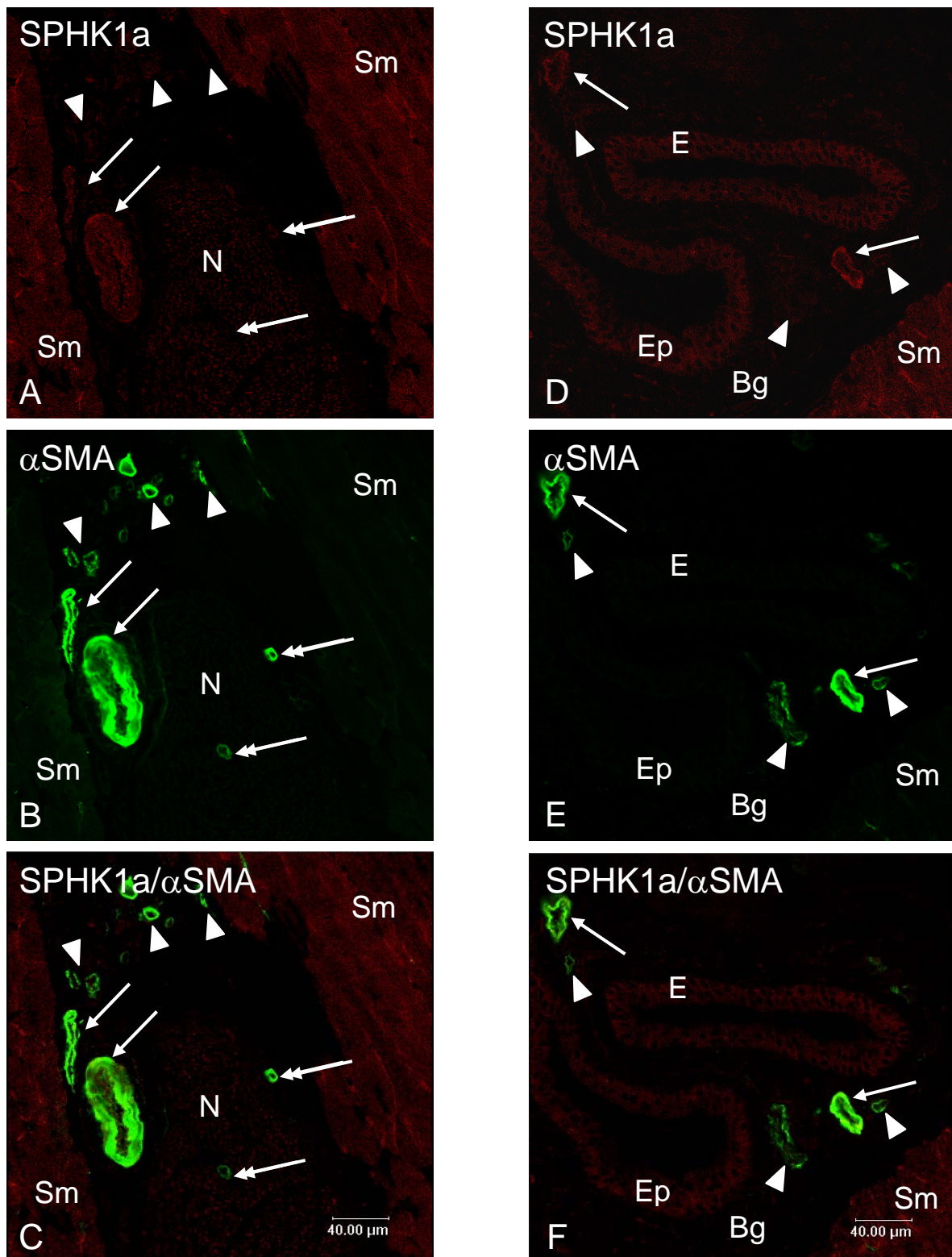


Abb. 38: Zunge, *N. lingualis*, Ausführungsgänge

Zwischen der nicht-reaktiven Skelettmuskulatur (Sm) sind größere Äste der A. lingualis (B: →) mit einer starken SPHK1a-IR (A: →) und kleinere Gefäße (B: ►) ohne SPHK1a-IR (A: ►) der glatten Muskelzellen abgrenzbar. Weiterhin weisen die Nervenfasern des N. lingualis (N) keine SPHK1a-IR auf. Intranervale Vasa nervorum zeigen keine SPHK1a-IR der glatten Gefäßmuskulatur (A: Doppelpfeil), sie sind nur an Hand der αSMA-IR (B: Doppelpfeil) abgrenzbar. Die Anschnitte der Drüsenausführungsgänge lassen weder im Epithel (Ep) noch im umgebenden Bindegewebe (Bg) eine SPHK1a-IR erkennen.

Ösophagus

Bei der Untersuchung des Ösophagus zeigte die Lamina epithelialis mucosae keine SPHK1a-IR (Abb. 39). Die glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae wiesen eine sehr starke SPHK1a-IR auf. Bei der Tunica muscularis konnte keine SPHK1a-IR der Skelettmuskelzellen dargestellt werden. Die glatten Muskelzellen der in der Lamina propria mucosae, der Tela submucosa und Tunica adventitia gelegenen Blutgefäße zeigten eine sehr starke SPHK1a-IR. Sogar die kleinen muskelschwachen Gefäßäste wiesen eine sehr starke IR der glatten Muskulatur auf. Nur bei den präkapillären Blutgefäßen war keine SPHK1a-IR nachweisbar.

Die miterfassten neuronalen Strukturen des Plexus myentericus, Nervenfasern und Ganglienzellkörper, wiesen keine SPHK1a-IR auf.

Tab. 10: SPHK1a-IR des Ösophagus

Gefäße	SPHK1a-IR		Anmerkungen
	Endothel	Tunica media	
▪ Arterien	-	+++	
▪ Venen	-	+++	
Wandschichten			
Lamina epithelialis mucosae	-		
Lamina muscularis mucosae	+++		
Tunica muscularis	-		
Plexus myentericus			
Ganglien	-		
Nervenfasern	-		

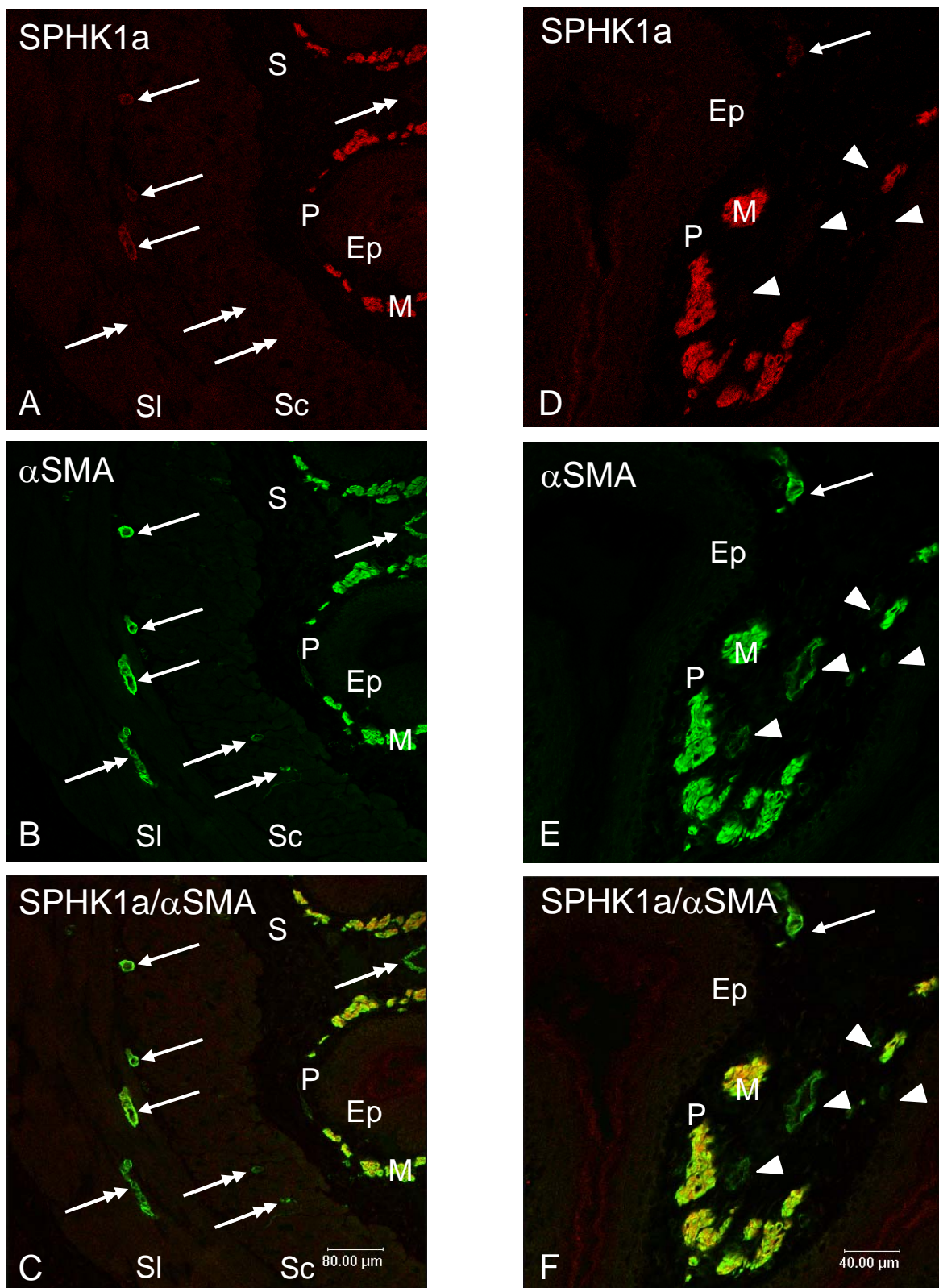


Abb. 39: Ösophagus

Die Lamina epithelialis mucosae (Ep) zeigt keine SPHK1a-IR des unverhornten Plattenepithels. In der Lamina propria mucosae (P) und Tela submucosa (S) weisen die verschiedenen Bindegewebszellen und -strukturen keine SPHK1a-IR auf, nur die glatten Gefäßmuskelzellen (B: →) zeigen eine starke SPHK1a-IR (A: →). Es sind auch kleine Blutgefäße (E: ►) abgrenzbar, die keine SPHK1a-IR der Tunica media besitzen (D: ►). Die Lamina muscularis mucosae (B, E: M) weist eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen auf (A, D: M). Die Skelettmuskulatur des Stratum circulare (Sc) und Stratum longitudinale (SI) zeigt keine SPHK1a-IR.

Duodenum, Jejunum

Die Epithelzellen der Lamina epithelialis mucosae zeigten keine SPHK1a-IR (Abb. 40). Jedoch waren in den Lieberkühn-Krypten bzw. Glandulae intestinales zwischen den nicht-reaktiven Epithelzellen vereinzelt Zellen mit einer starken SPHK1a-IR abgrenzbar, die kein glattes Muskelzellaktin enthielten (Abb. 41). In der Lamina propria mucosae zeigte das Bindegewebe keine, die vereinzelt lokalisierten glatten Muskelzellen eine sehr starke SPHK1a-IR (Abb. 40). Die kleinen Blutgefäße der Schleimhaut ließen keine SPHK1a-IR der Tunica media erkennen (Abb. 40). Die glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae wiesen eine sehr starke SPHK1a-IR auf (Abb. 40, 41). Die Blutgefäße in der Tela submucosa und in der Tela subserosa bzw. Tunica adventitia zeigten eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Gefäßmuskulatur (Abb. 40). Hierbei wiesen die Arterien eine stärkere SPHK1a-IR auf als die zugehörigen Venen. Das Stratum circulare und longitudinale der Tunica muscularis zeigten eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen.

In der Tunica muscularis konnte bei den angeschnittenen Ganglienzellkörpern und vegetativen Nervenfasern des Plexus myentericus keine SPHK1a-IR festgestellt werden (Abb. 40).

Tab. 11: SPHK1a-IR des Duodenums und Jejunums

Gefäße	SPHK1a-IR		Anmerkungen
	Endothel	Tunica media	
▪ Arterien	-	+++	
▪ Venen	-	++	
Wandschichten			
Lamina epithelialis mucosae	-/+++ ¹⁰		¹⁰ vereinzelt Zellen in Krypten
Lamina muscularis mucosae	+++		
Tunica muscularis	+++		
Plexus myentericus			
Ganglien	-		
Nervenfasern	-		

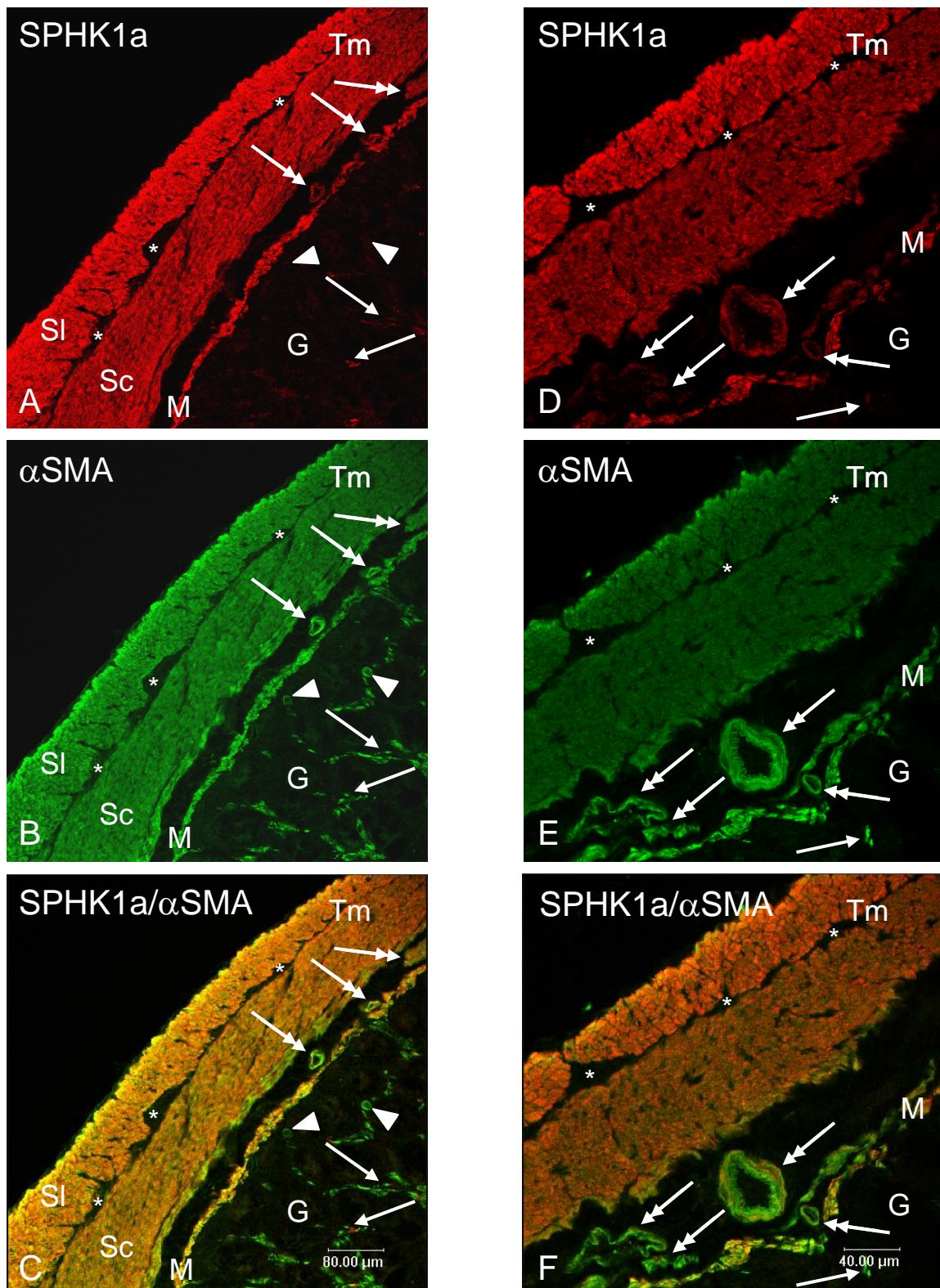


Abb. 40: Duodenum, Tunica muscularis

Die in den Glandulae intestinales (G) vereinzelt lokalisierten glatten Muskelzellen (B, E: →) zeigen eine starke SPHK1a-IR (A, D: →). Die glatten Gefäßmuskelzellen (B: ►) in der Lamina propria mucosae weisen jedoch keine SPHK1a-IR auf (A: ►). Die Blutgefäße (B, E: Doppelpfeil) v.a. in der Tela submucosa lassen eine starke SPHK1a-IR der Tunica media erkennen (A, D: Doppelpfeil). Die glatte Darmmuskulatur in der Tunica muscularis mucosae (B, E: M) und Tunica muscularis (B, E: Tm) zeigt eine sehr starke SPHK1a-IR (A, D: Tm, M). Der zwischen dem Stratum circulare (Sc) und Stratum longitudinale (Sl) lokalisierte Plexus myentericus (*) weist keine SPHK1a-IR der Ganglienzellen oder Nervenfasern auf.

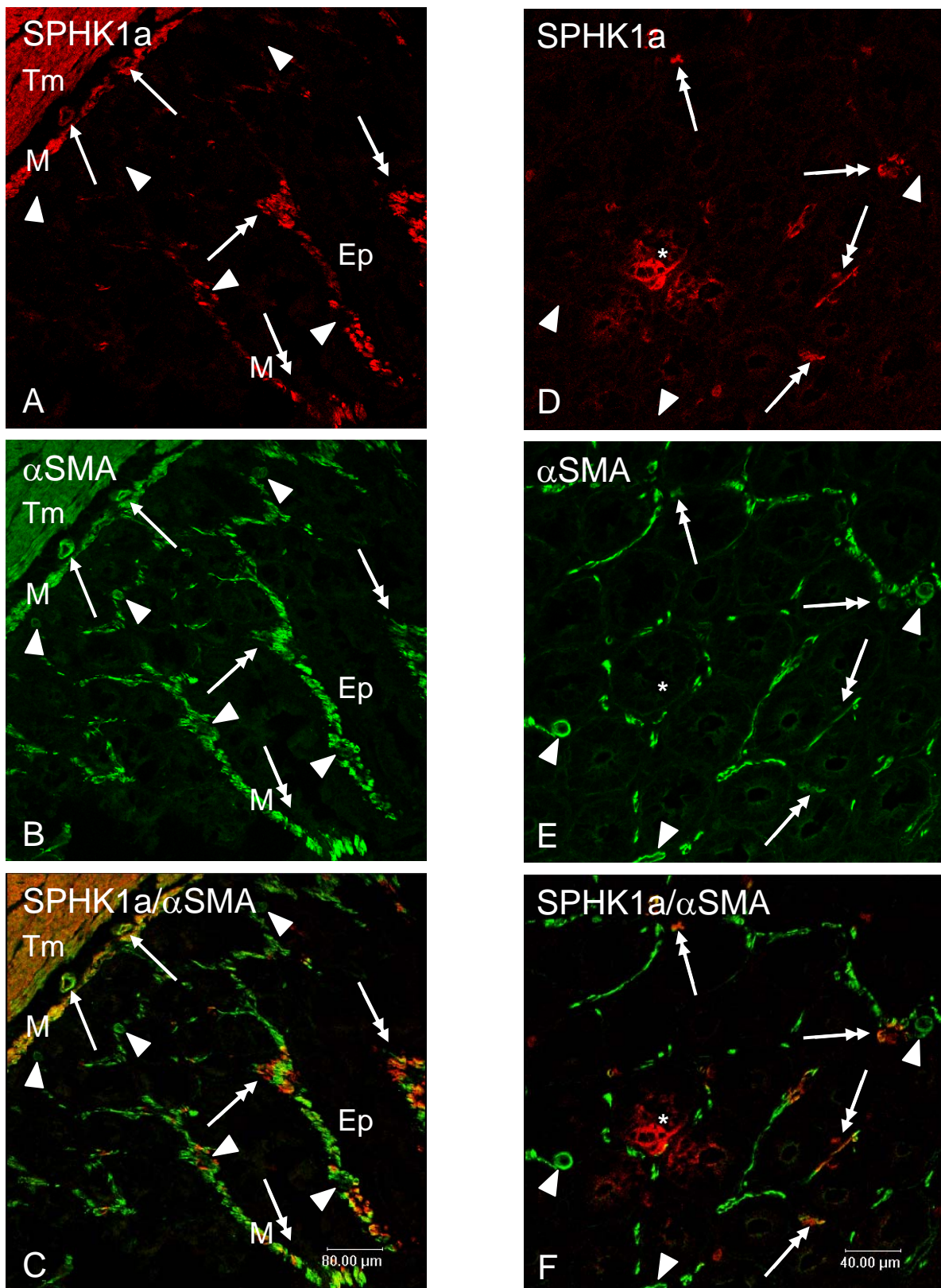


Abb. 41: Duodenum, Zotten

Die Zotten zeigen eine sehr starke IR der in der Lamina muscularis mucosae (M) gelegenen glatten Muskelzellen (Doppelpfeil). Es sind einige Gefäße (B: →) mit einer sehr starken IR der Tunica media nachweisbar (A: →). Weiterhin sind auch kleine Gefäße (B, E: ►) abgrenzbar, die keine SPHK1a-IR der glatten Muskulatur aufweisen (A, D: ►). Die glatten Muskelzellen der außen angrenzende Tunica muscularis (B: Tm) zeigen eine sehr starke SPHK1a-IR (A: Tm). Einzelne Zellen (A:*) der nicht-reaktiven Lamina epithelialis mucosae (Ep) zeigen eine sehr starke SPHK1a-IR im Bereich der Glandulae duodenales.

Leber

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen der Leber zeigten die glatten Gefäßmuskeln der Aa. interlobulares in den periportalen Feldern eine sehr starke und die der Vv. interlobulares keine bis eine geringe SPHK1a-IR (Abb. 42). Die Ductus interlobulares biliferi wiesen keine SPHK1a-IR des kubischen Epithels und der muskelfreien Lamina propria auf. Bei den Vv. centrales konnte nur bei einzelnen glatten Muskelzellen eine geringe SPHK1a-Immunreaktivität nachgewiesen werden, die meisten zeigten jedoch nur eine α SMA-IR (Abb. 43). Die radiär angeordneten Sinusoide, bestehend aus gefensterten Endothelzellen und Kupfferzellen, wiesen keine SPHK1a-IR auf. Auch die zwischen den Sinusoiden gelegenen Hepatozyten ließen in keinem Bereich der Lobuli hepatici eine SPHK1a-IR erkennen.

Tab. 12: SPHK1a-IR der Leber

Gefäße	SPHK1a-IR		Anmerkungen
	Endothel	Tunica media	
Aa. interlobulares	-	+++	
Vv. interlobulares	-	+/-	
Vv. centrales	-	-/+ ¹¹	¹¹ vereinzelte Zellen
Sinusoide	-	-	
Leberparenchym			
Hepatozyten	-		
Ductus interlobulares biliferi	-		

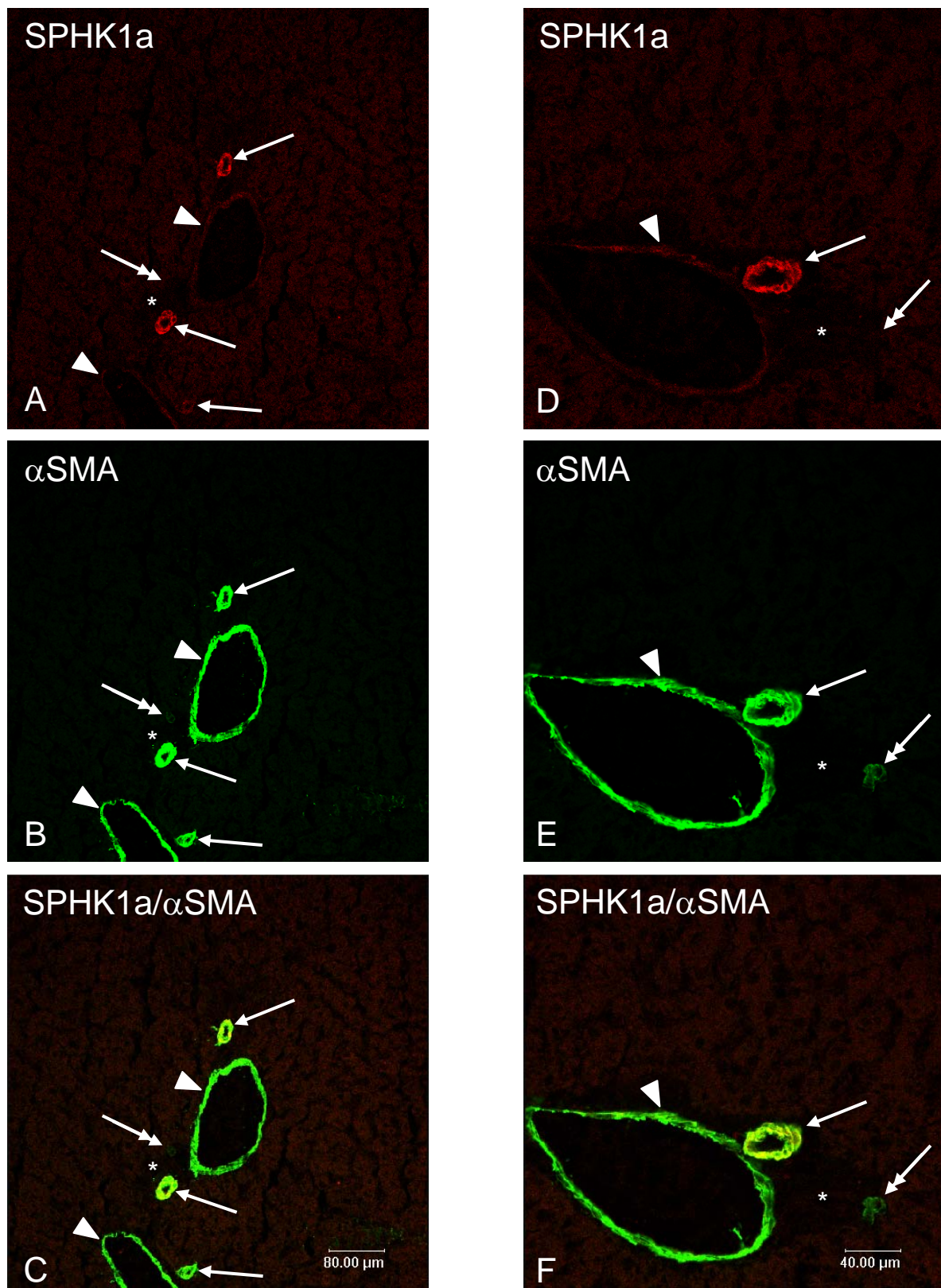


Abb. 42: Leber, periportales Feld

Die glatte Muskulatur der Aa. (B, E: →) und Vv. interlobulares (B, E: ►) zeigt eine sehr starke (A, D: →) bzw. geringe SPHK1a-IR (A, D: ►) bei gleich starker αSMA-IR. Der Ductus interlobares biliferi (B, E: *) lässt keine SPHK1a-IR erkennen (A, D: *). Die sehr kleinen muskelschwachen Blutgefäße (B, E: Doppelpfeil) zeigen keine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A, D: Doppelpfeil). Bei den umgebenden Hepatozyten und Sinusoiden ist keine SPHK1a-IR der verschiedenen Zellpopulationen feststellbar.

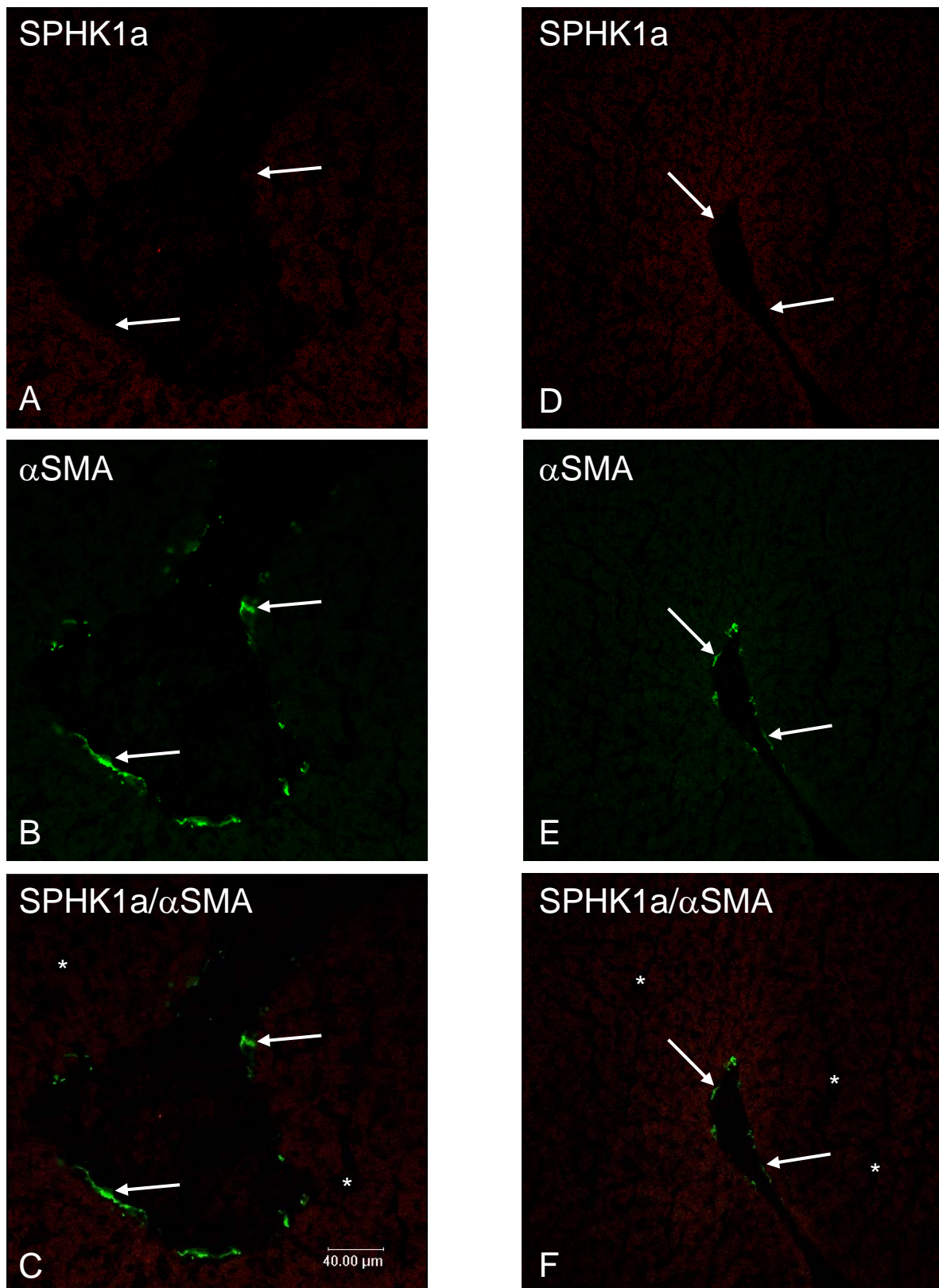


Abb. 43: Leber, Vv. centrales

Die im Läppchenzentrum gelegenen Vv. centrales weisen keine SPHK1a-IR der wenigen glatten Muskelzellen (B, E: →) auf (A, D: →). Auch die Endothelzellen zeigen keine SPHK1a-IR. Die umgebenden Hepatozyten und die in die Zentralvene mündenden Sinusoide (*) weisen keine SPHK1a-IR auf.

Pankreas

Die das Pankreas versorgenden Blutgefäße zeigten eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (Abb. 44). Im Vergleich zu den Arterien wiesen die zugehörigen Venen eine geringere SPHK1a-IR der Tunica media auf (Abb. 45). Mit Verringerung des Durchmessers ließ die SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen nach und verschwand bei den sehr kleinen muskelschwachen Gefäßen völlig (Abb. 44). Das dichte Netzwerk von Kapillaren wies keine SPHK1a-IR auf. Die Endothelzellen der Blutgefäße zeigten keine SPHK1a-IR. Perivaskulär waren vereinzelte Zellen mit einer sehr starken SPHK1a-IR des Zytoplasmas lokalisiert, diese zeigten jedoch keine α SMA-IR (Abb. 45). Die SPHK1a-immunreaktive Zellen wurden nicht näher charakterisiert, es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Zellen des immunologischen Systems.

Die verschiedenen Zellpopulationen des Pankreas, sowohl die exo- als auch die endokrinen Drüsenzellen, wiesen keine SPHK1a-IR auf (Abb. 44, 45). Die die Azini umgebende Basallamina und die sich darunter befindenden retikulären Fasern zeigten keine SPHK1a-IR. Auch bei der Wand der Ausführungsgänge war keine SPHK1a-IR der Epithel- oder Bindegewebezellen nachweisbar.

Tab. 13: SPHK1a-IR des Pankreas

Gefäße	SPHK1a-IR		Anmerkungen
	Endothel	Tunica media	
▪ Arterien	-	+++	
▪ Venen	-	++	
▪ Kapillaren	-		
Pankreaszellpopulationen			
Exokrine Zellen	-		
Endokrine Zellen	-		
Pankreasgänge	-		

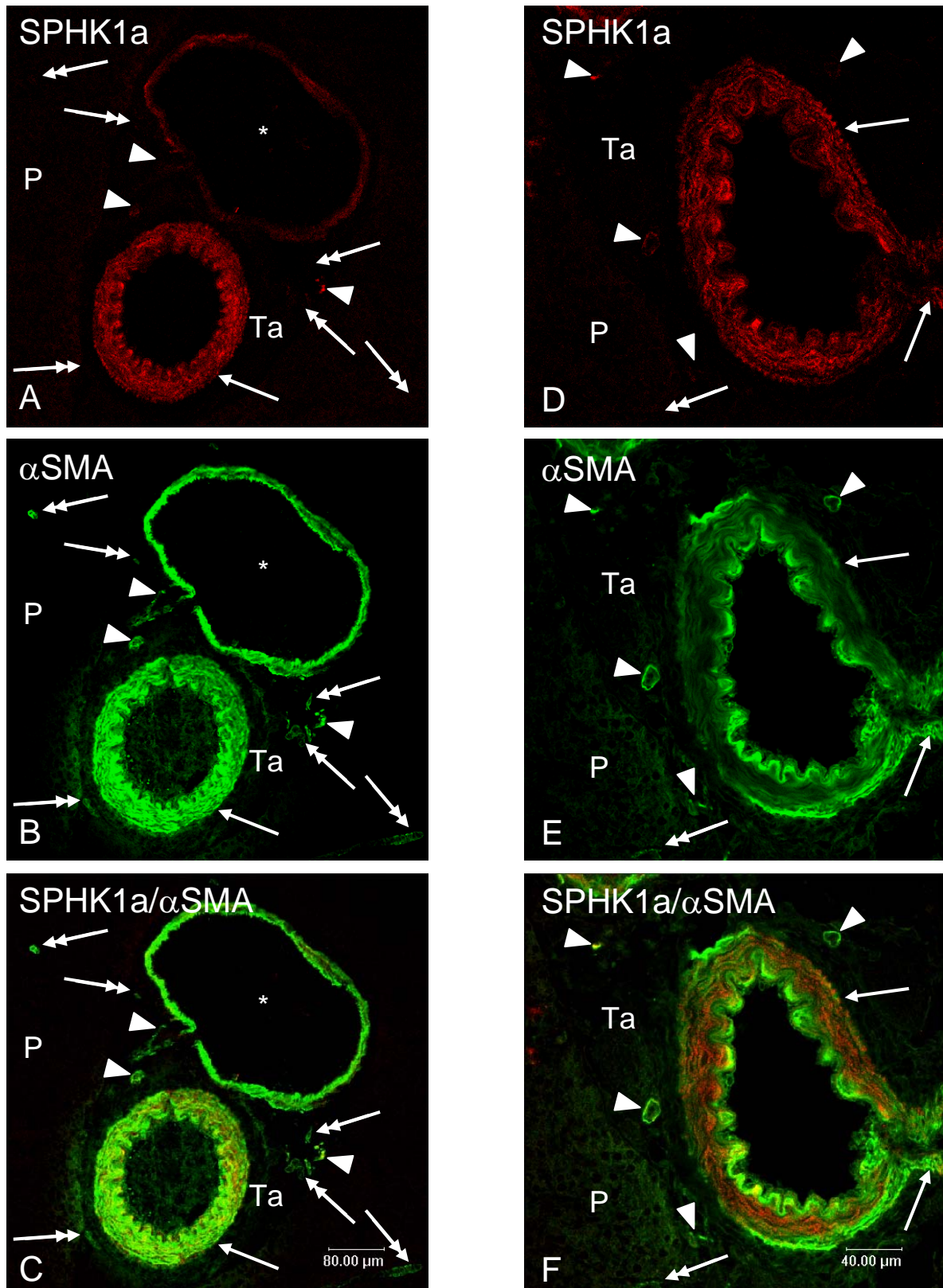


Abb. 44: Pankreas, Blutgefäße mit großem Gefäßdurchmessers

Die Arterien (B, E: →) zeigen eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A, D: →). Im Vergleich zur Arterie (A: →) weist die zugehörige Vene (A: *) eine deutlich geringere SPHK1a-IR bei gleich starker α SMA-IR (B) auf. Bei den kleineren Blutgefäßen (B, E: ►) verringert sich die SPHK1a-IR (A, D: ►) und verschwindet bei den sehr muskelschwachen Gefäßen (B, E: Doppelpfeil) völlig (A, D: Doppelpfeil). Das umgebende Bindegewebe der Tunica adventitia (Ta) zeigt keine SPHK1a-IR. Bei dem Parenchym (P) des Pankreas lässt sich keine SPHK1a-IR der unterschiedlichen Zellpopulationen nachweisen.

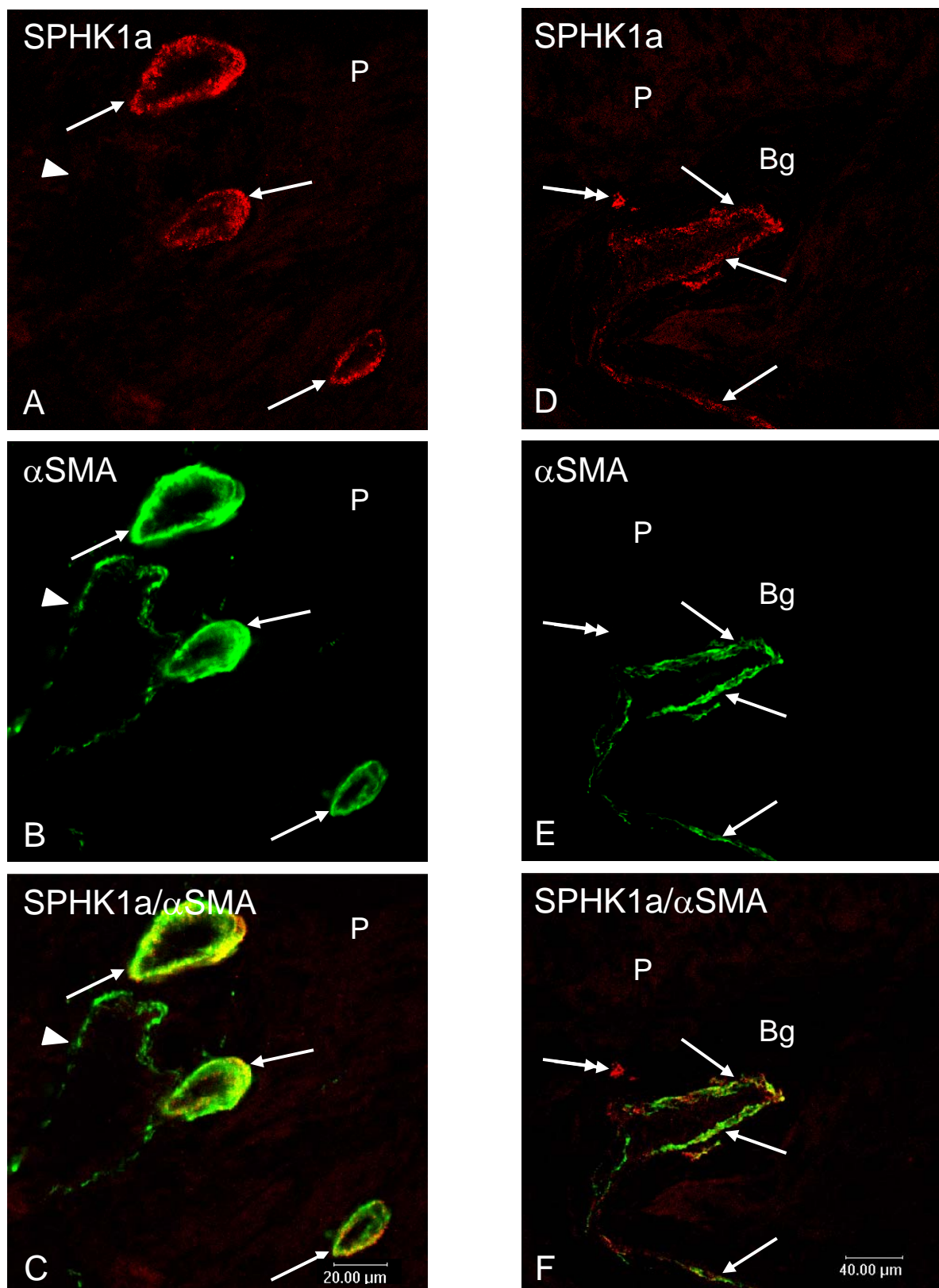


Abb. 45: Pankreas, Blutgefäße (A-C), perivaskuläre SPHK1a-immunreaktive Zellen (D-F)

Die Arterien (B: →) lassen im Vergleich zur begleitenden Vene (▶) eine deutlich stärkere SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen erkennen (A: →). Die glatten Muskelzellen der Gefäße (B, E: →) weisen eine starke SPHK1a-IR auf (A, D: →). Im umgebenden nicht-reaktiven Bindegewebe (Bg) der Tunica adventitia ist eine Zelle mit einer sehr starken SPHK1a-IR abgrenzbar (A, D: Doppelpfeil), die kein glattes Muskelzellaktin (B, E: Doppelpfeil) besitzt. Das Pankreasparenchym (P) zeigt keine SPHK1a-IR der verschiedenen exo- und endokrinen Drüsenzellen.

Nervensystem

Gehirn

Die oberflächlichen, intracerebralen und -cerebellaren Blutgefäße zeigten eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskulatur (Abb. 46, 47). Im Vergleich zu anderen Geweben wiesen auch die kleineren Arteriolen und Venolen eine sehr starke SPHK1a-IR der Tunica media auf. Bei den präkapillären Blutgefäßen konnte keine SPHK1a-IR der glatten Muskulatur festgestellt werden (Abb. 47). Auch die Kapillarnetze des Cerebrums und Cerebellums zeigten keine SPHK1a-IR. Bei den Endothelzellen der Blutgefäße war keine SPHK1a-IR nachweisbar. Auch das Bindegewebe in der Tunica adventitia wies keine SPHK1a-IR auf. Die Blutgefäße des Plexus choroideus ließen eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen erkennen, das Endothel war nicht-reaktiv (Abb. 47).

Die graue Substanz des Cerebrums und Cerebellums ließ keine SPHK1a-IR der verschiedenen Neuronenpopulationen und Gliazellen erkennen. Auch die weiße Substanz, hauptsächlich aus myelinisierten Axonen und Oligodendrozyten bestehend, wies keine SPHK1a-IR der Zellen und Strukturen auf. Die angeschnittenen Hirnnerven an der Schädelbasis ließen keine SPHK1a-IR der verschiedenen Nervenfasernpopulationen und der Bindegewebshüllen erkennen. Bei den intraneuralen Vasa nervorum konnte keine SPHK1a-IR der glatten Muskulatur nachgewiesen werden. Die angeschnittenen Hirnhäute, Arachnoidea und Pia mater, zeigten keine SPHK1a-IR der verschiedenen Zellen und Strukturen. Der Plexus choroideus, bestehend aus Auffaltungen der Pia mater, wies keine SPHK1a-IR des Epithels und des lockeren Bindegewebes auf.

Bei den Untersuchungen mit Isopropanol-fixiertem Hirngewebe zeigten einige in Aceton-Fixierung nicht immunreaktive Nervenzellkörper eine sehr starke SPHK1a-IR (Abb. 48). Diese immunreaktiven Neurone waren in verschiedenen Bereichen des Cerebrums lokalisiert: in direkter Nachbarschaft der Ventrikel und in einigen unterschiedlichen Arealen der grauen Substanz. Neurone mit SPHK1a-IR konnten nur im Cerebrum aufgefunden werden. Die verschiedenen Nervenzellkörper im Cerebellum wiesen keine SPHK1a-IR auf. Die SPHK1a-IR der glatten Gefäßmuskelzellen stellte sich unabhängig von der Art der Fixierung mit sehr starker SPHK1a-IR dar.

Tab. 14: SPHK1a-IR des Gehirns

	SPHK1a-IR		Anmerkungen
Gefäße	Endothel	Tunica media	
▪ Arterien	-	+++	
▪ Venen	-	+++	
Cerebrum	Aceton	Isopropanol	
Neurone	-	-/+++ ¹²	¹² nur bestimmte cerebrale Areale
Gliazellen	-	-	
Cerebellum			
Neurone	-		
Gliazellen	-		

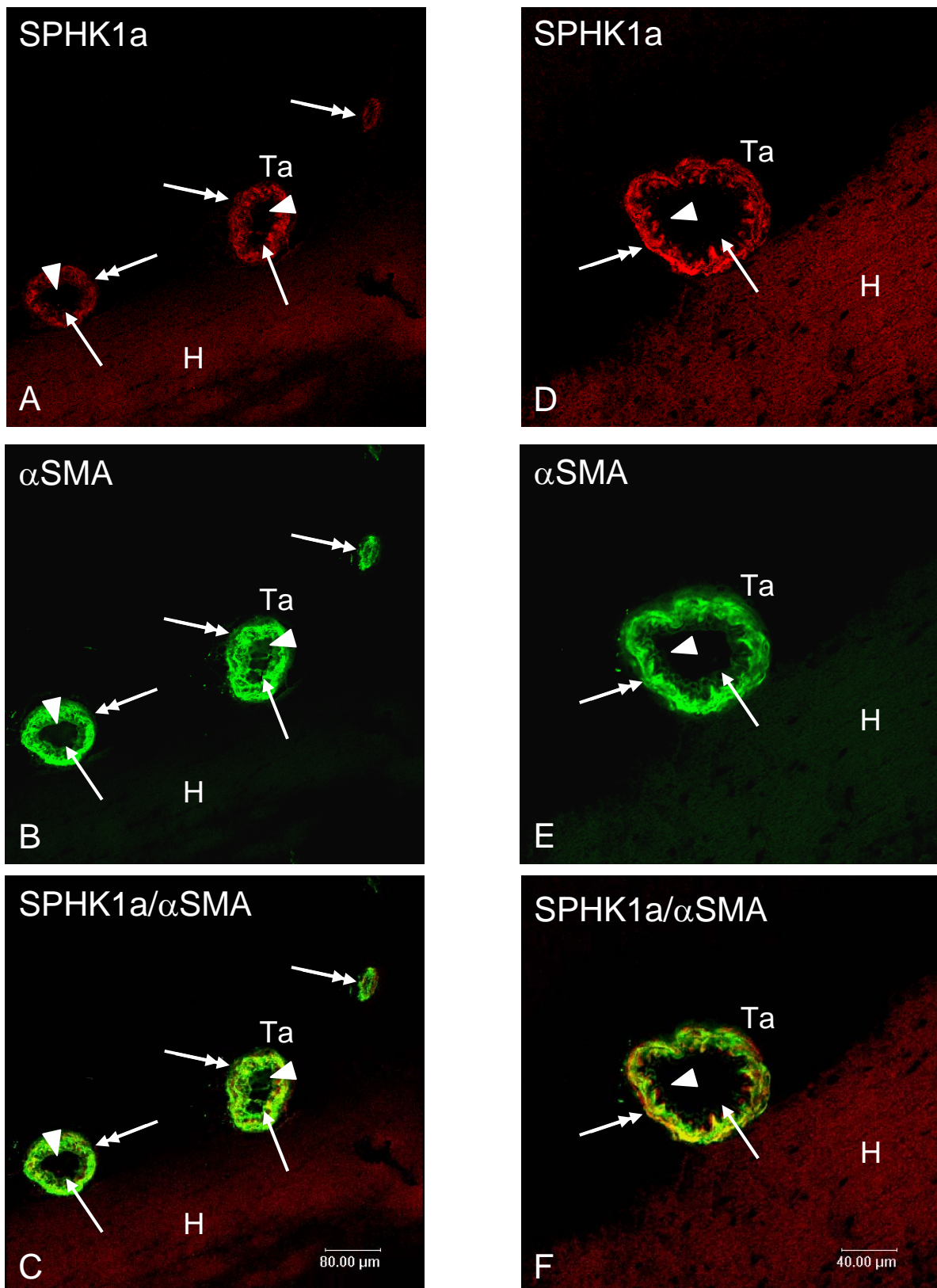


Abb. 46: Cerebrum, oberflächliche Blutgefäße

Das Endothel der oberflächlichen Blutgefäße (►) weist keine SPHK1a-IR auf. Die direkt darunter liegende Membrana elastica interna (→) ist gut durch den gewellten Verlauf der nicht-reaktiven elastischen Fasern erkennbar. Die darauf folgende Tunica media (B, E: Doppelpfeil) zeigt eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A, D: Doppelpfeil). Bei der Tunica adventitia (Ta) lässt sich keine SPHK1a-IR des Bindegewebes feststellen. Das umgebende Hirngewebe (H) weist keine SPHK1a-IR der verschiedenen Neuronenpopulationen oder Nervenfasern auf.

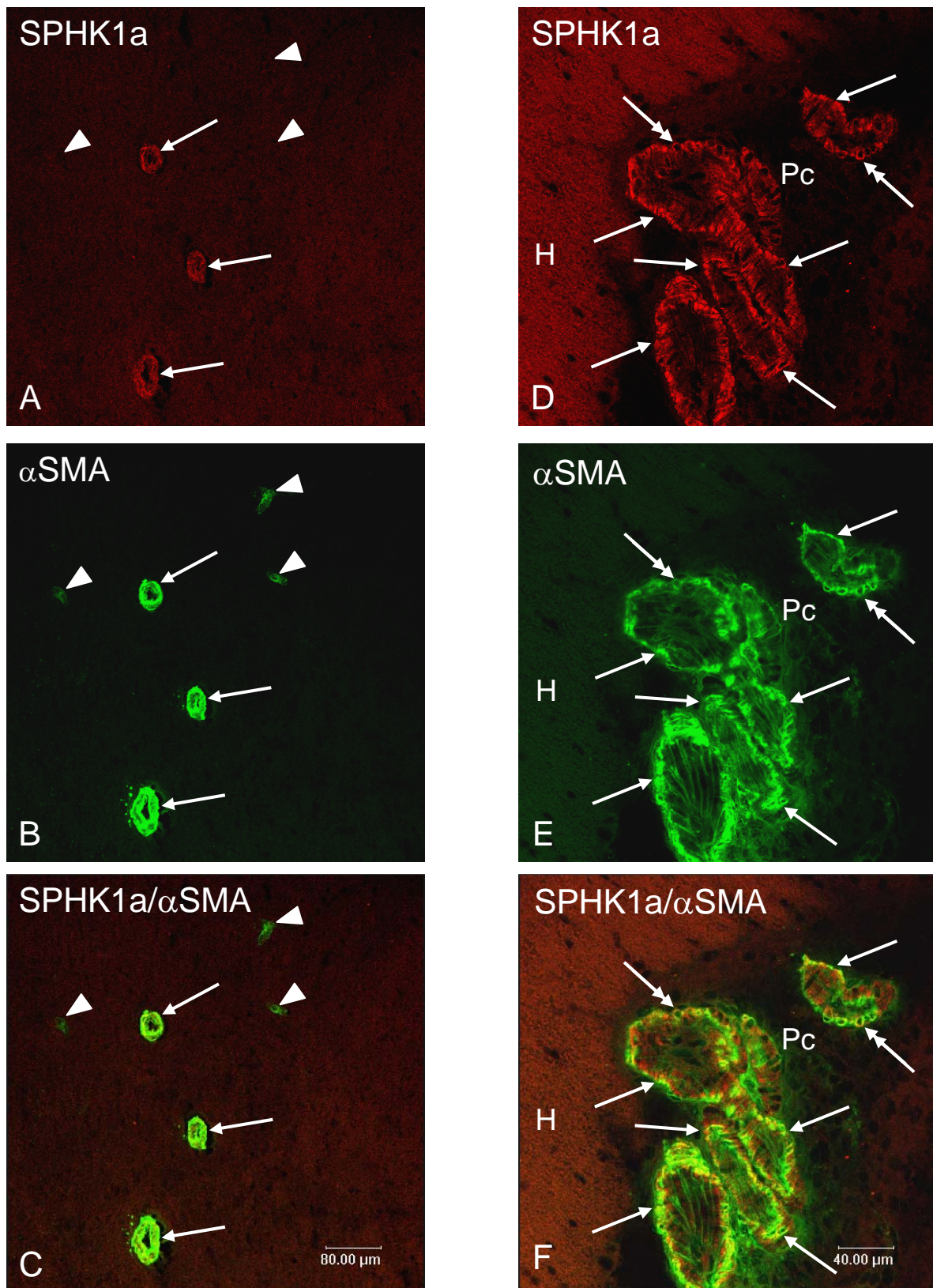


Abb. 47: Cerebrum, Blutgefäße unterschiedlichen Durchmessers (A-C), Plexus choroideus (D-F)

Die glatten Muskelzellen der Blutgefäße (B: →) weisen eine sehr starke SPHK1a-IR auf (A: →), während bei den kleinen muskelschwachen Gefäßen keine SPHK1a-IR der Tunica media (B: ►) zu beobachten ist (A: ►). Das umgebende Hirngewebe (H) lässt keine SPHK1a-IR erkennen. Der reich vaskularisierte Plexus choroideus (Pc) zeigt keine SPHK1a-IR des Epithels oder des lockeren Bindegewebes, nur die Muskelzellen der Blutgefäße (E: →) weisen eine sehr starke SPHK1a-IR des Zytosols auf (D: →), der Zellkern hingegen zeigt keine SPHK1a-IR (D: Doppelpfeil).

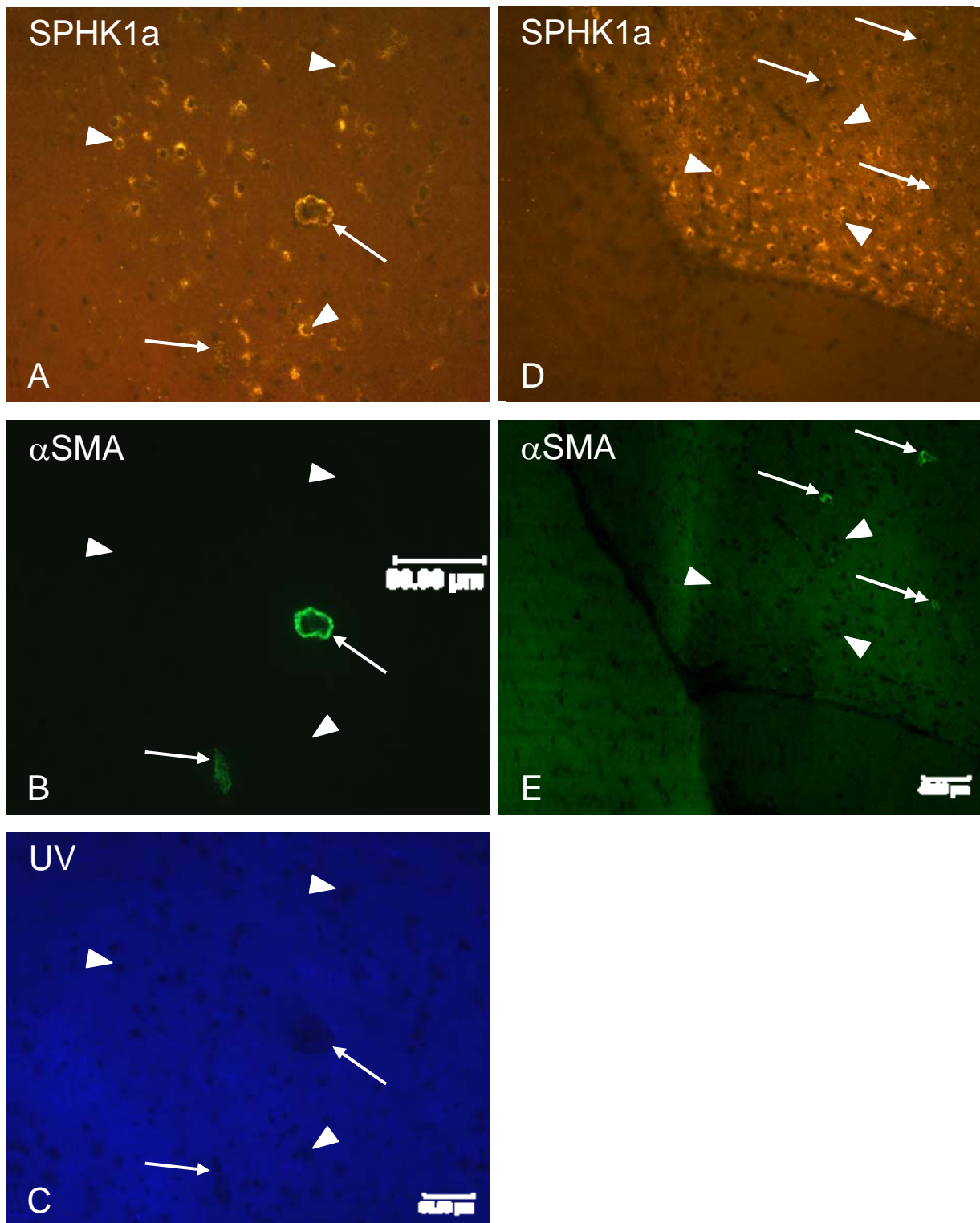


Abb. 48: Cerebrale Neurone in Isopropanol-Fixierung

Die Blutgefäße des Cerebrums (B, E: \rightarrow) zeigen eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A, D: \rightarrow), aber keine SPHK1a-IR des Endothels. Das kleinere Blutgefäß (Doppelpfeil) weist keine SPHK1a-IR (A: Doppelpfeil) mehr auf. Nur in wenigen Arealen zeigen die cerebralen Neurone eine sehr starke SPHK1a-IR (A, D: \blacktriangleright). Eine Autoimmunfluoreszenz der Neurone konnte ausgeschlossen werden (C).

Spinalganglien

Die Untersuchung der Spinalganglien zeigte bei den extraganglionären Blutgefäßen eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (Abb. 49). Die intraganglionär gelegenen Gefäße wiesen keine SPHK1a-IR der Tunica media auf. Das Endothel und die Tunica adventitia ließen keine SPHK1a-IR erkennen.

Die pseudounipolaren Neurone der Spinalganglien mit den umgebenden Satellitenzellen zeigten keine SPHK1a-IR. Bei den verschiedenen angeschnittenen Nervenfasern konnte keine SPHK1a-IR der Axone, der Myelinscheiden oder der bindegewebigen Hülle nachgewiesen werden.

Die SPHK1a-IR der verschiedenen Zellen und Strukturen der Spinalganglien stellte sich hierbei unabhängig von der Art der Gewebefixierung dar.

Tab. 15: SPHK1a-IR der Spinalganglien

	SPHK1a-IR	
Gefäße	Endothel	Tunica media
▪ Intraganglionär	-	-
▪ Extraganglionär	-	++
Spinalganglien		
Ganglienzellen	-	
Satellitenzellen	-	
Nervenfasern	-	

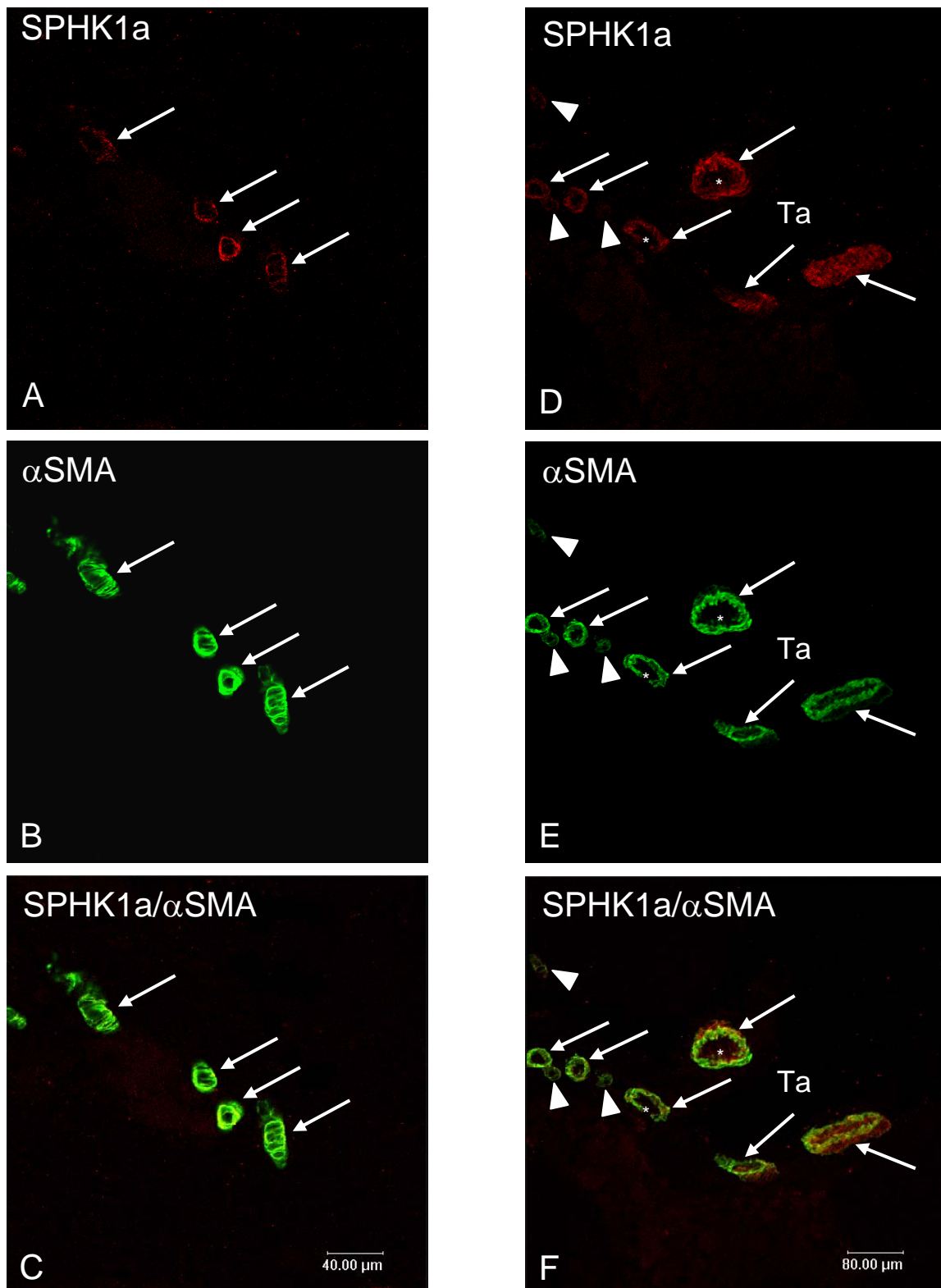


Abb. 49: Spinalganglien

Die glatte Muskulatur der extraganglionären Blutgefäße (B, E: →) zeigen eine starke SPHK1a-IR (A, D: →). Das Endothel (*) und die Bindegewebszellen der Tunica adventitia (Ta) wiesen keine SPHK1a-IR auf. Die kleinen Gefäße (E: ►) lassen nur noch eine geringe SPHK1a-IR der Muskulatur erkennen (D: ►).

N. ischiadicus

Die begleitenden Vasa nervorum zeigten perinerval eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskulatur (Abb. 50). Die im Endoneurium gelegenen Blutgefäße wiesen nur eine geringe bis keine SPHK1a-IR der Tunica media auf. Bei dem Endothel wie auch beim Bindegewebe der Tunica adventitia wurde keine SPHK1a-IR nachgewiesen.

Die verschiedenen Nervenfaserp Populationen des N. ischiadicus, sensible wie motorische, ließen keine SPHK1a-IR der Axone oder Myelinscheiden erkennen. Die unterschiedlichen Hüllen, wie Peri- und Epineurium, zeigten keine SPHK1a-IR der verschiedenen Zellen und Strukturen.

Bei der Untersuchung des Isopropanol-fixierten N. ischiadicus zeigte sich kein Unterschied zum Aceton-fixierten Gewebe.

Tab. 16: SPHK1a-IR des N. ischiadicus

	SPHK1a-IR	
Gefäße	Endothel	Tunica media
▪ Vasa nervorum	-	+/-
▪ Extranerval	-	++
Neuronale Strukturen		
Nervenfasern	-	

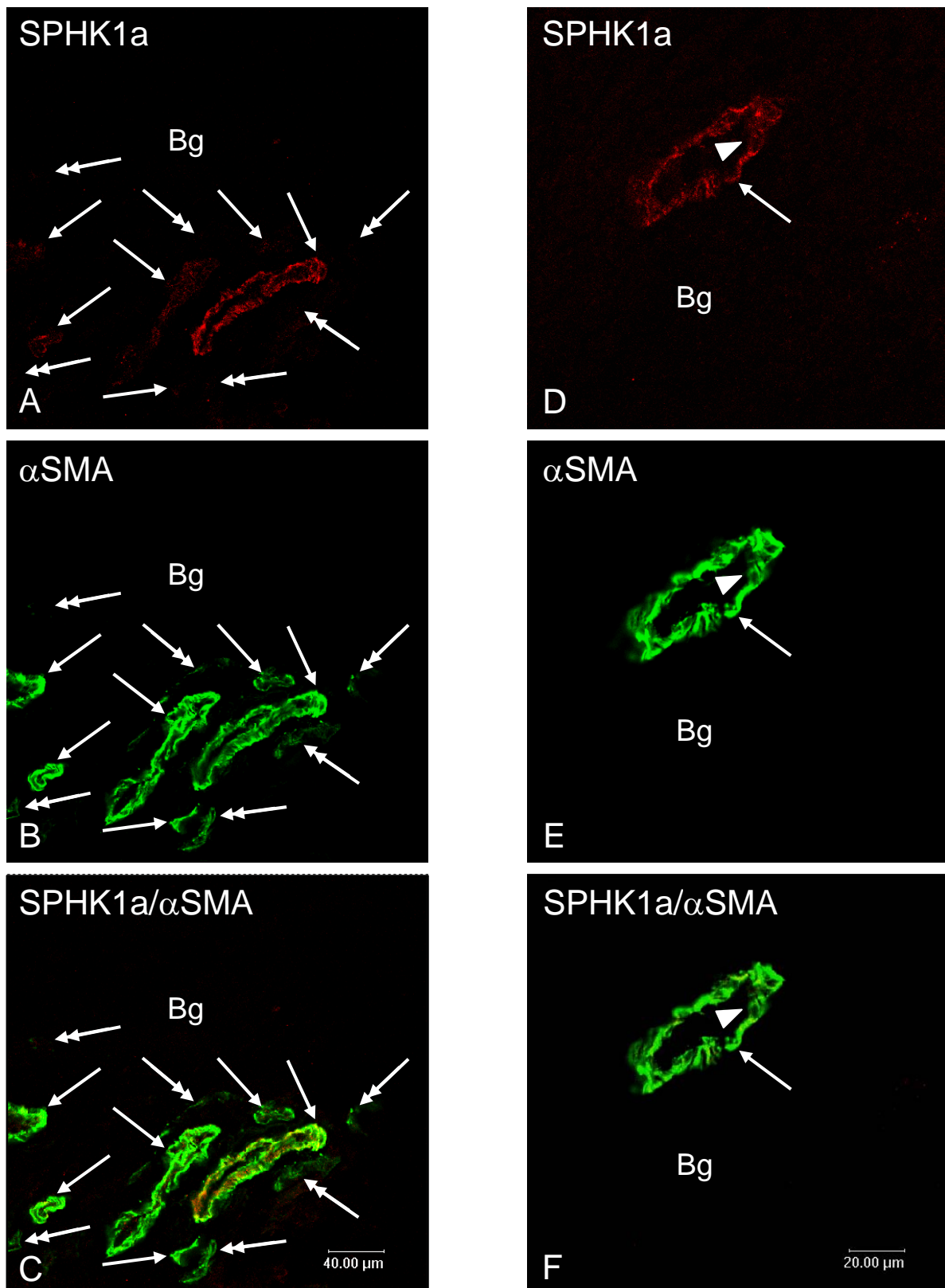


Abb. 50: N. ischiadicus, Vasa nervorum

Die epineuralen Blutgefäße (B, E: →) zeigen eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A, D: →). Die sehr kleinen und muskelschwachen Gefäßen weisen bei unveränderter αSMA-IR (B, E: Doppelpfeil) keine SPHK1a-IR auf (A, D: Doppelpfeil). Die Endothelzellen (▶) und die Bindegewebszellen (Bg) der Tunica adventitia zeigen bei Gefäßen aller Größen keine SPHK1a-IR.

Urogenitaltrakt

Niere

Die verschiedenen Gefäße der Niere zeigten keine SPHK1a-IR des Endothels, jedoch konnte eine unterschiedliche Intensität der IR der Tunica media festgestellt werden: Die großen Gefäße, Aa. et Vv. segmentales, Aa. et Vv. interlobares und Aa. et Vv. arcuatae, wiesen eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskulatur auf (Abb. 51). Bei kleineren Gefäßen, wie den Aa. und Vv. corticales radiatae, war eine sehr starke SPHK1a-IR der Tunica media feststellbar. Jedoch gab es einige wenige der kleineren Gefäße, die keine SPHK1a-immunreaktiven glatten Muskelzellen besaßen. Die Vasa afferentes und efferentes zeigten zum größten Teil eine starke SPHK1a-IR der Media, einige wenige dieser Gefäße wiesen keine SPHK1a-IR auf (Abb. 52). Die Vasa recta in der Medulla renalis wiesen keine SPKH1a-IR der Tunica media oder Intima auf. In den Epithelien von Glomeruli und den verschiedenen Tubulipopulationen konnte keine SPHK1a-IR nachgewiesen werden (Abb. 52). Auch die Zellen der Pyramis renalis zeigten keine SPHK1a-IR. Die glatten Muskelzellen in der Wand des Nierenbeckens dagegen wiesen eine sehr starke SPHK1a-IR auf (Abb. 52). In der Rindenregion konnten zwischen den Tubuli und Corpusculi renales einzelne verzweigte, stark SPHK1a-immunreaktive Zellen dargestellt werden, die keine α SMA-IR zeigten. Bei Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit dem Antikörper OX6 wies eine Subpopulation der interstitiellen SPHK1a-immunreaktiven Zellen eine Kolokalisation mit MHCII-IR auf (Abb. 53). Jedoch war die SPHK1a-IR der interstitiellen Zellen nicht präabsorbierbar und somit handelt es sich hierbei am ehesten um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers an die immunologischen Zellen. Weitere Doppelimmunreaktivitätsuntersuchungen mit den Antikörpern ED1 (Abb. 54), ED2 (Abb. 55) oder einem Antikörper gegen rPH(β) (Abb. 56) zeigten keine Kolokalisation mit SPHK1a.

Im Vergleich von Aceton- und Isopropanol-fixiertem Gewebe gab es hinsichtlich der Verteilung SPHK1a-immunreaktiver Zellen Unterschiede: Die Anzahl der SPHK1a-immunreaktiven Gefäße, sowohl der muskelzellreichen Arteriolen, der Venolen, als auch der Vasa afferentes und efferentes, war wesentlich geringer in Aceton-fixiertem Nierengewebe als in Isopropanol-fixiertem. Im Gegensatz zu Aceton-fixiertem Gewebe konnten SPHK1a-immunreaktive glatte Muskelzellen in Isopropanol-fixiertem Gewebe bis in das Glomerulum hinein nachgewiesen werden.

Die zwischen den Tubuli gelegenen, verzweigten, SPHK 1a-immunreaktiven Zellen waren in Aceton-fixierten Präparaten wesentlich weniger zu finden als in Gewebeschnitten mit Isopropanol-Fixierung.

Tab. 17: SPHK1a-IR der Niere

	SPHK1a-IR		Anmerkungen
Gefäße	Endothel	Tunica media	
▪ Aa. interlobares	-	++	
▪ Aa. acuatae	-	++	
▪ Aa. corticales radiatae	-	+++/- ¹³	¹³ geringere IR bei Acetonfixierung
▪ Vasa afferentes/efferentes	-	++/- ¹³	
▪ Vasa recta	-	-	
Niere			
Pyramis renalis	-		
Tubuli	-		
Glomeruli	-		
Interstitielle Zellen	++		
Nierenbecken	+++		Glatte Muskulatur

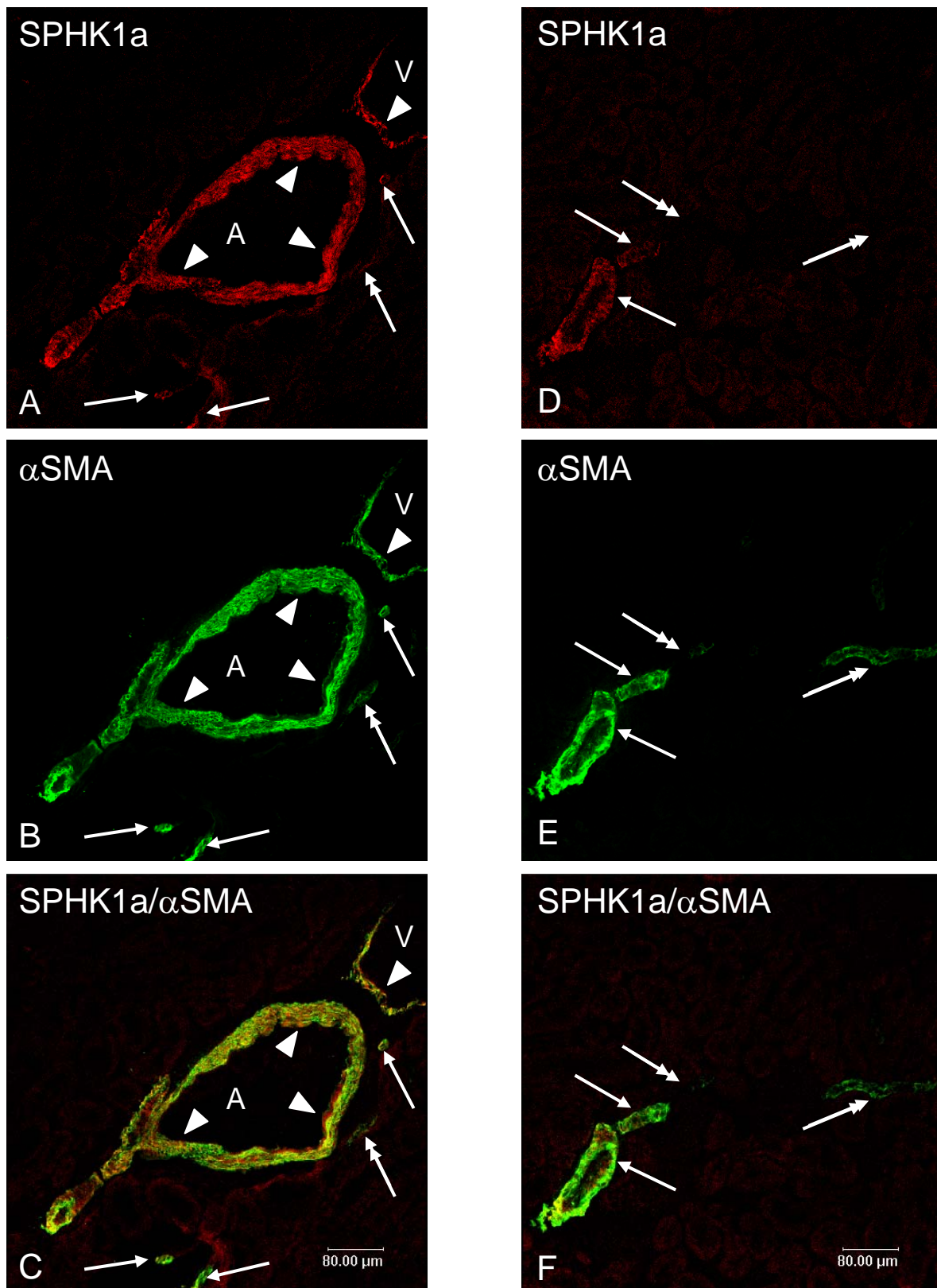


Abb. 51: Niere, Gefäße

Die glatte Muskulatur der größeren Arterien (A) und Venen (V) zeigt eine sehr starke SPHK1a-IR. Die Gefäße kleineren Durchmessers (B, E: →) weisen zum größten Teil eine starke IR der Tunica media auf (A, D: →). Es sind aber auch Gefäße (E: Doppelpfeil) abgrenzbar, die keine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen zeigen (D: Doppelpfeil). Das Endothel (▶) lässt unabhängig von der Gefäßgröße keine SPHK1a-IR erkennen. Im Nierenparenchym lassen sich weder in den Glomeruli, dem Bindegewebe oder den verschiedenen Tubulipopulationen immunreaktive Zellen abgrenzen.

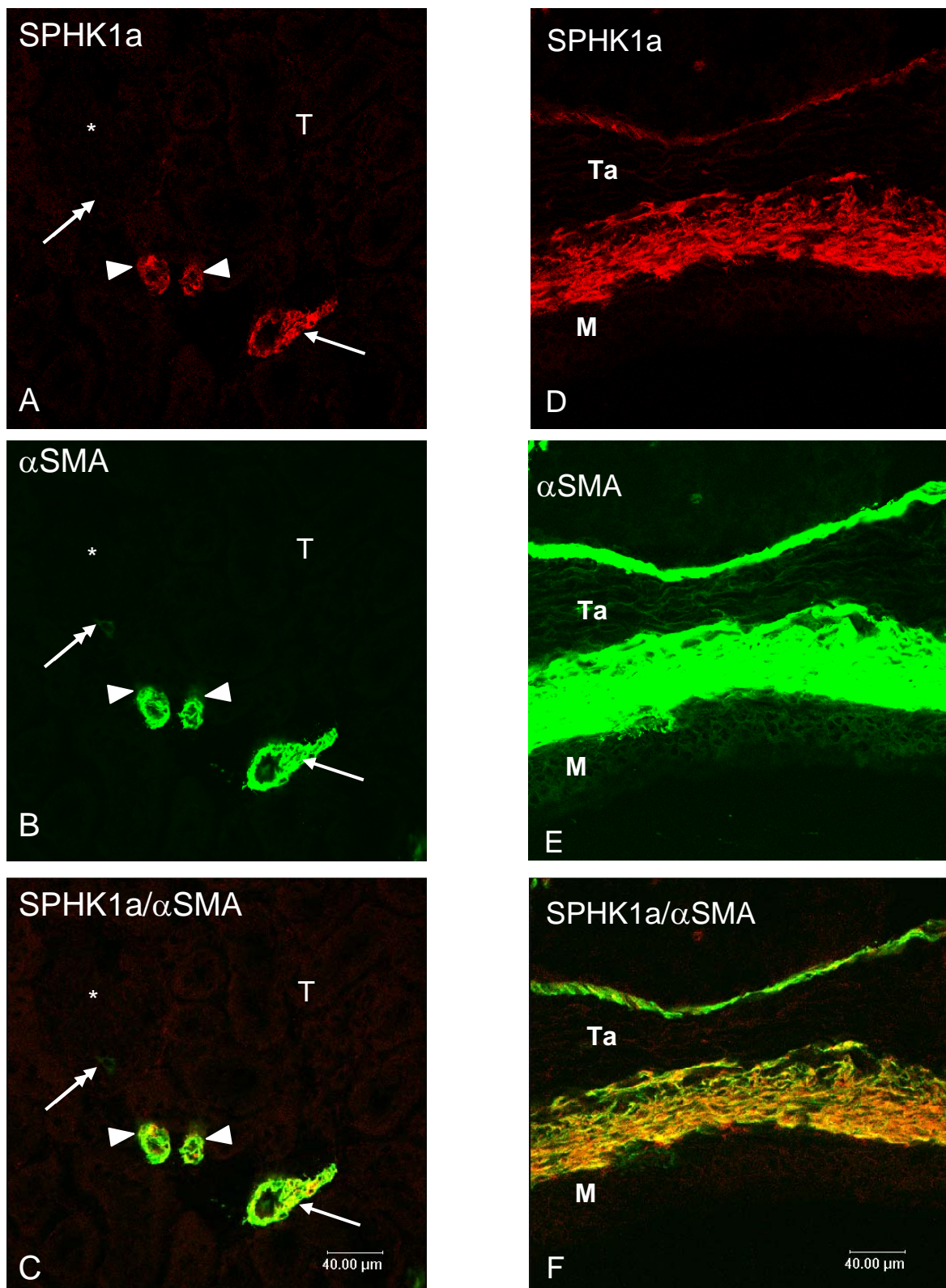


Abb. 52: Niere, Arteriola afferens/efferens (A-C), Pelvis renalis (D-F)

Die Gefäße weisen eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskulatur (B: →, ►) auf (A: →, ►). Die Arteriola afferens/efferens (►) sind kurz vor Eintritt ins bzw. Austritt aus dem Glomerulum (*) angeschnitten. Die wenige glatte Muskulatur (B: Doppelpfeil), die am glomerulären Gefäßpol angeschnitten ist, zeigt keine SPHK1a-IR (A: Doppelpfeil). Auch das Glomerulum (*) und die Tubuli (T) zeigen keine SPHK1a-IR.

Im Pelvis renalis weist die Tunica mucosa (M) keine SPHK1a-IR auf. Die darauf folgende Schicht der Tunica muscularis (B, E: Tm) zeigt eine sehr starke IR der glatten Muskelzellen (A, D: Tm). In der Tunica adventitia (Ta) lassen das Bindegewebe und auch das kleine Blutgefäß (B: →) keine SPHK1a-IR erkennen (A: →).

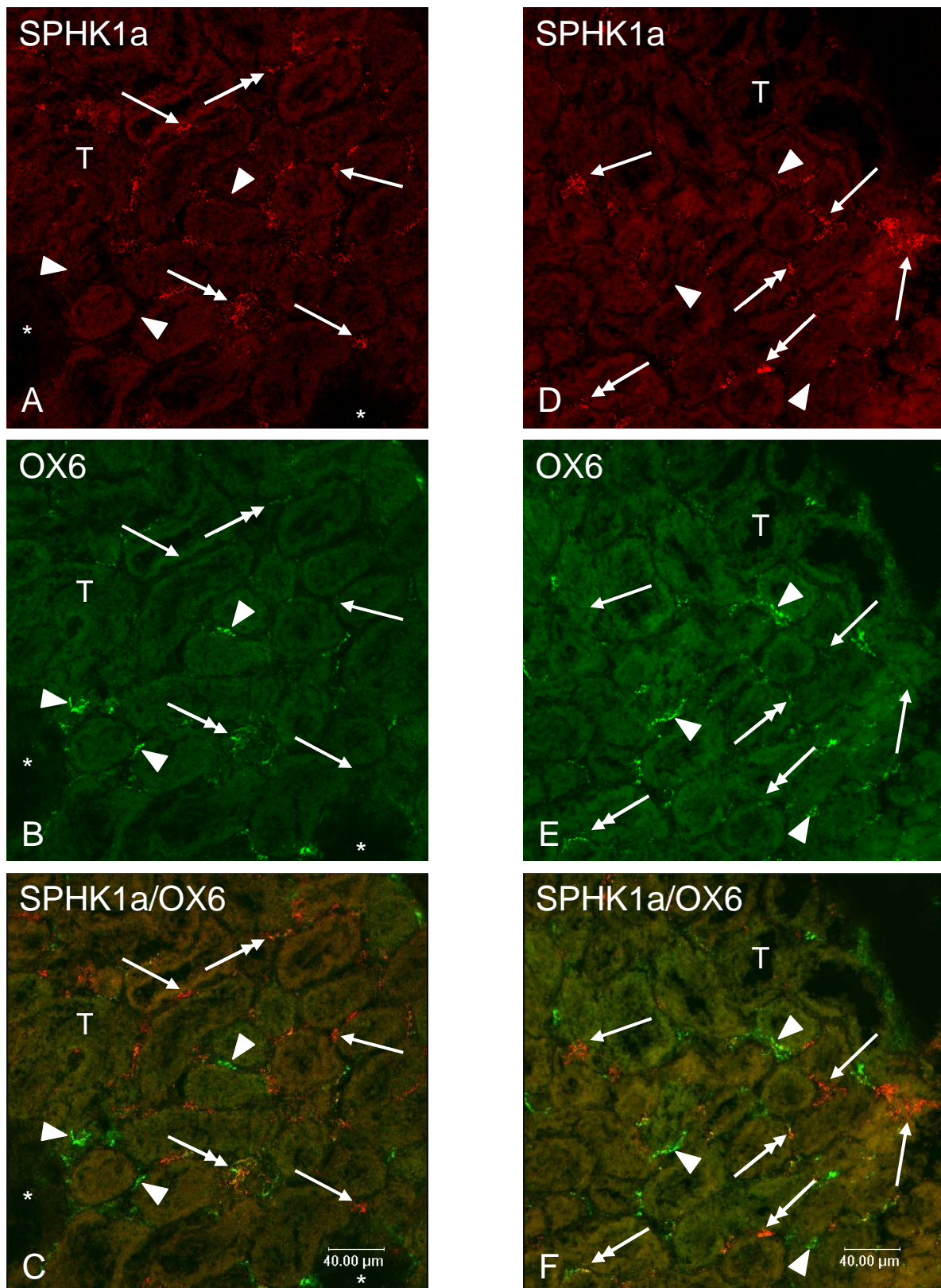


Abb. 53: Niere, Doppelimmunfluoreszenz mit OX6-Antikörper gegen MHCII
Zwischen den nicht-reaktiven Tubuli (T) stellen sich sowohl SPHK1a- (A, D:→) als auch MHCII-immunreaktive (B, E: ►) Zellen dar. Einige der immunreaktiven Zellen weisen auch eine SPHK1a-MHCII-Kolokalisation auf (C, F: Doppelpfeil).

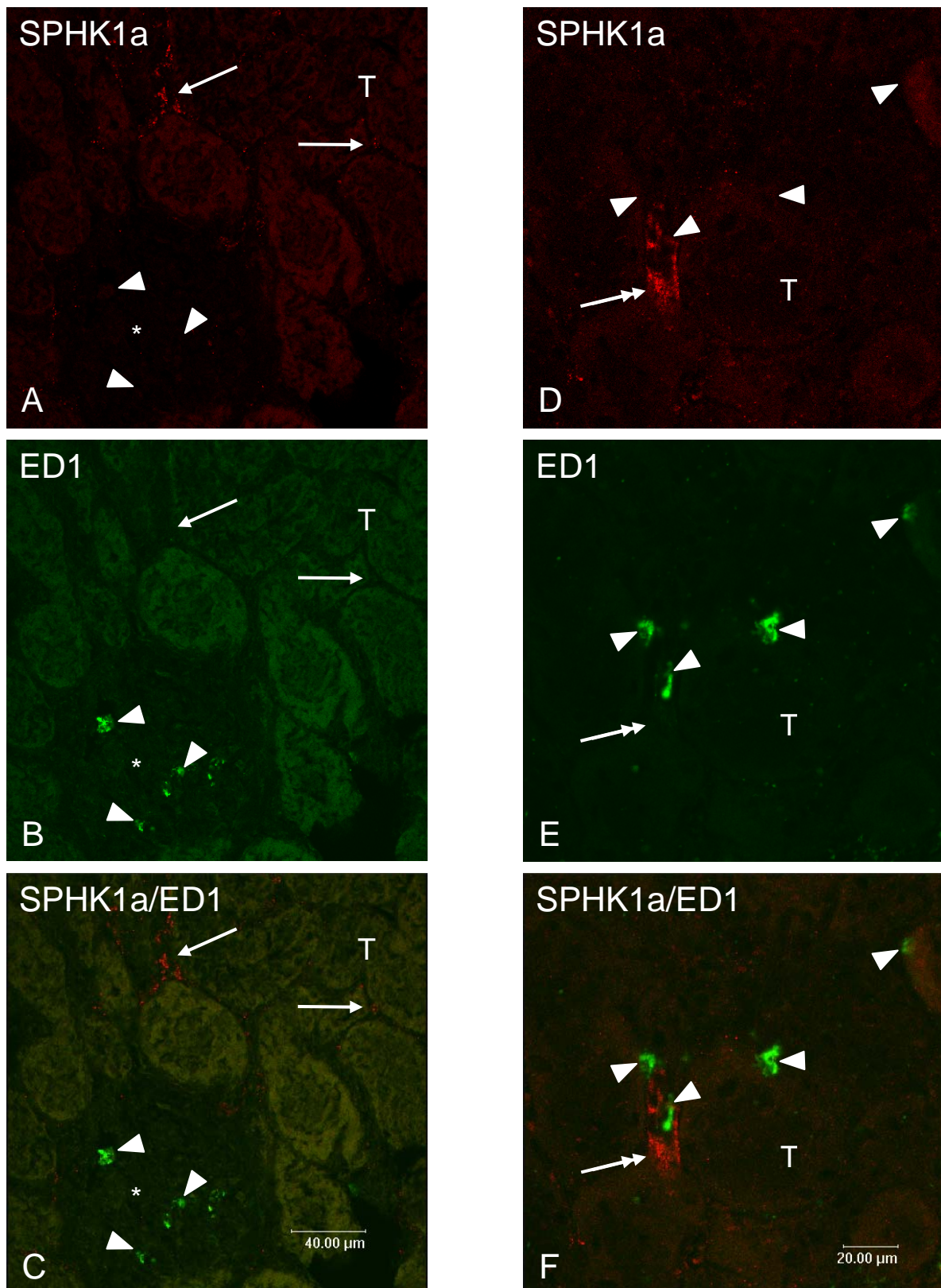


Abb. 54: Niere, SPHK1a-ED1-Doppelimmunfluoreszenz

Die Epithelzellen der verschiedenen Tubulipopulationen (T) und auch die unterschiedlichen glomerulären Zellen (*) zeigen keine SPHK1a-IR. Im Interstitium der Nierenrinde stellen sich einige SPHK1a-immunreaktive Zellen dar (A, D: →), die jedoch keine ED1-IR aufweisen (B, D: →). Ferner sind auch einige Monozyten/Makrophagen mit ED1-IR nachweisbar (B, D: ►).

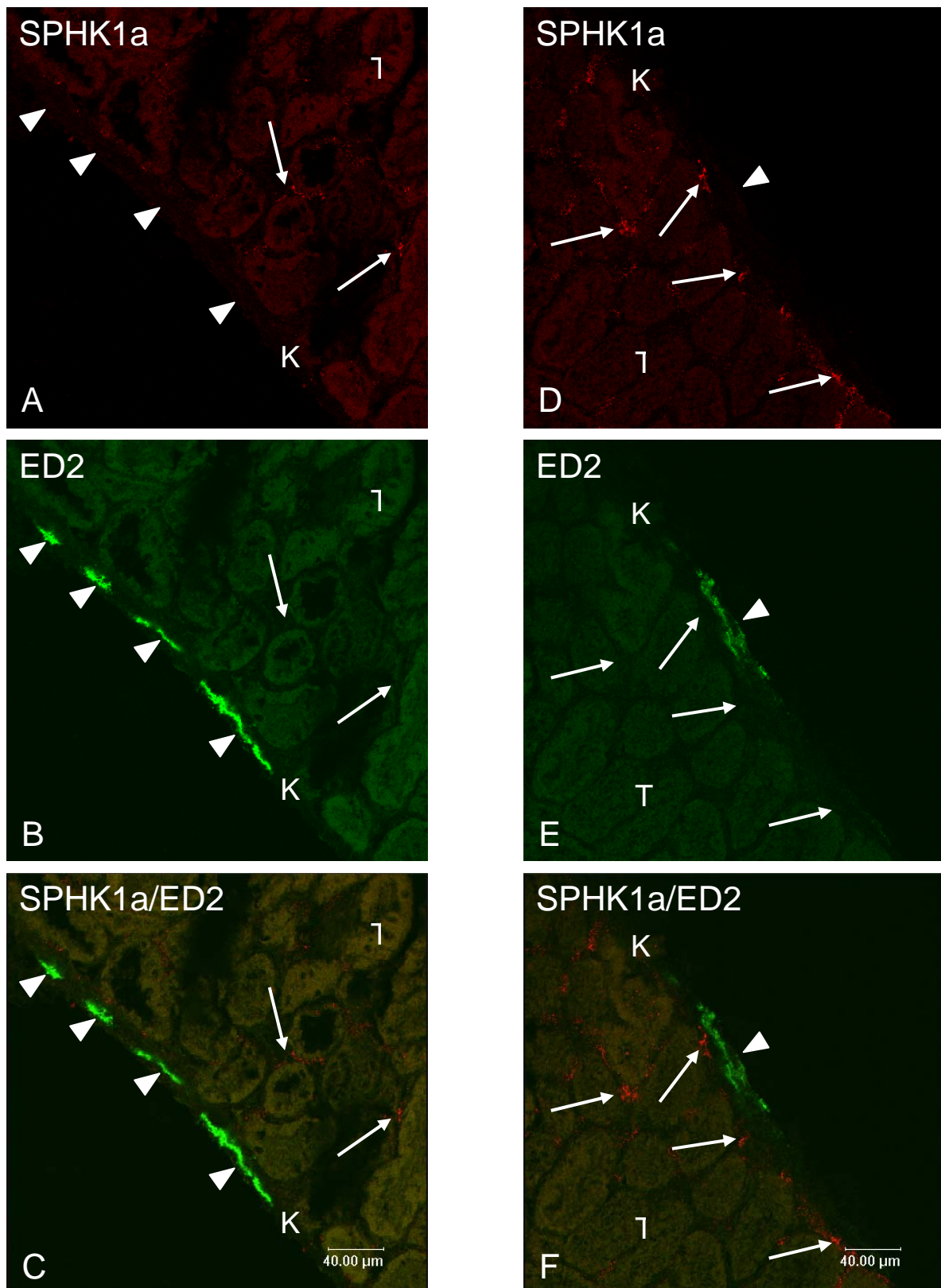


Abb. 55: Niere, Doppelimmunfluoreszenz mit ED2

Das Nierenparenchym mit den Epithelzellen der Tubuli (T) und die Bindegewebszellen der Kapsel (K) und des Interstitiums zeigen keine SPHK1a-IR. Zwischen den Tubuli sind einzelne verzweigte SPHK1a-immunreaktive Zellen abgrenzbar (A, D: →), die keine ED2-IR aufweisen (B, E: →). In der bindegewebigen Nierenkapsel liegen einige ED2-immunreaktive Zellen (B, E: ►), die aber keine SPHK1a-IR aufweisen (A, D: ►).

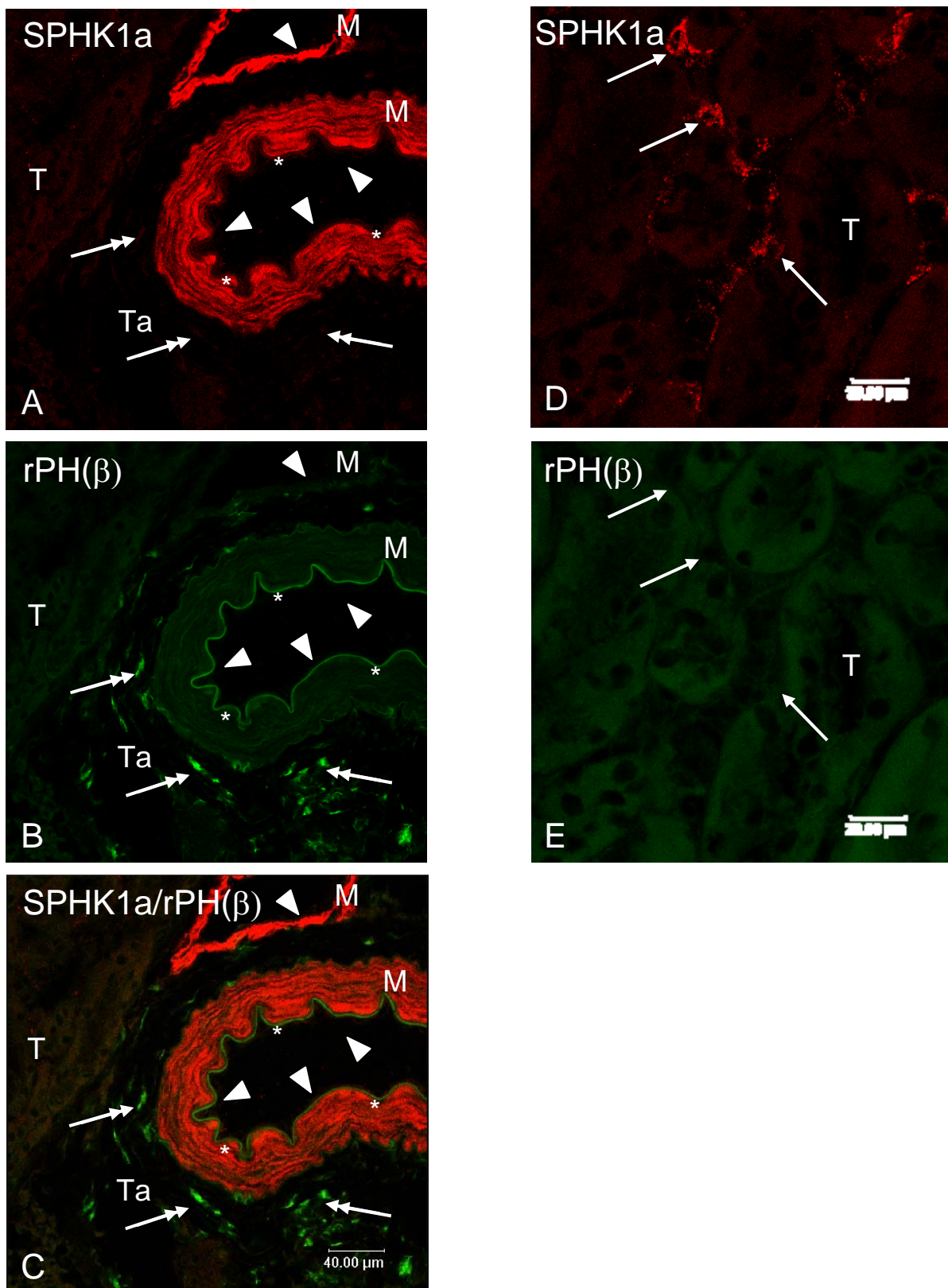


Abb. 56: Niere, SPHK1a-rPH(β)-Doppelimmunfluoreszenz

Die Gefäße zeigen eine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A: M). Das Gefäßendothel (►) weist keine IR auf. Die Membrana elastica interna ist durch die autofluoreszenten elastischen Fasern gut abgrenzbar (*). In der Tunica adventitia (Ta) der großen Arterie sind viele Fibroblasten (E: Doppelpfeil) abgrenzbar, die nicht SPHK1a-immunreaktiv sind (A: Doppelpfeil). Zwischen den nicht-reaktiven Epithelzellen der Tubuli (T) sind interstitielle, verzweigte Zellen mit einer sehr starken SPHK1a-IR lokalisiert (D: →). Diese Zellen zeigen jedoch keine rPH(β)-IR (E: →).

Uterus

Bei der Untersuchung des Uterus zeigte sich eine starke SPHK1a-IR der Tunica media der A. uterina und deren Äste (Abb. 57). Im Perimetrium konnte keine IR des Bindegewebes oder des Mesothels festgestellt werden. Die glatten Muskelzellen wiesen im Myometrium eine sehr starke IR auf: Die äußere Ringmuskulatur zeigte eine deutlich stärkere SPHK1a-IR als die innere Längsmuskulatur (Abb. 57, 58). Im Bindegewebe des Myometriums waren zwischen den Bündeln glatter Muskelzellen vereinzelt Zellen mit einer sehr starken SPHK1a-IR zu finden (Abb. 57). Im Endometrium zeigten die tubulären, bisweilen gegabelten Glandulae uterinae und auch das faserarme Bindegewebe keine SPHK1a-IR (Abb. 58). Einige sehr stark SPHK1a-immunreaktive Zellen, teils spindelförmig, teils verzweigt, stellten sich im endometrialen Bindegewebe dar (Abb. 58). Die Zellen waren zum Teil konzentrisch um die Spiralarterien angeordnet oder verliefen parallel zur Myometrium-Endometrium-Grenze. Zur näheren Zellartbestimmung wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit ED1-, ED2- und OX6-Antikörper durchgeführt, jedoch zeigte sich keine Kolokalisation mit SPHK1a (Abb. 59-61). Auch weitere Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit einem Antikörper gegen Vimentin, einem Marker der Fibroblasten, konnten keinen Aufschluss über den Zelltypus der immunreaktiven Zellen geben, da keine Kolokalisation mit SPHK1a festgestellt wurde (Abb. 62).

Tab. 18: SPHK1a-IR des Uterus

Uterus	SPHK1a-IR		Anmerkungen
Gefäße	Endothel	Tunica media	
▪ Arterien	-	++	peri- und myometrial
▪ Venen	-	++	
Uterus			
Perimetrium	+++		Glatte Muskelzellen
Myometrium	+++		Glatte Muskelzellen
Endometrium	++		Zellen nicht näher bestimmbar
▪ Glandulae uterinae	-		
▪ Spiralarterien	-		

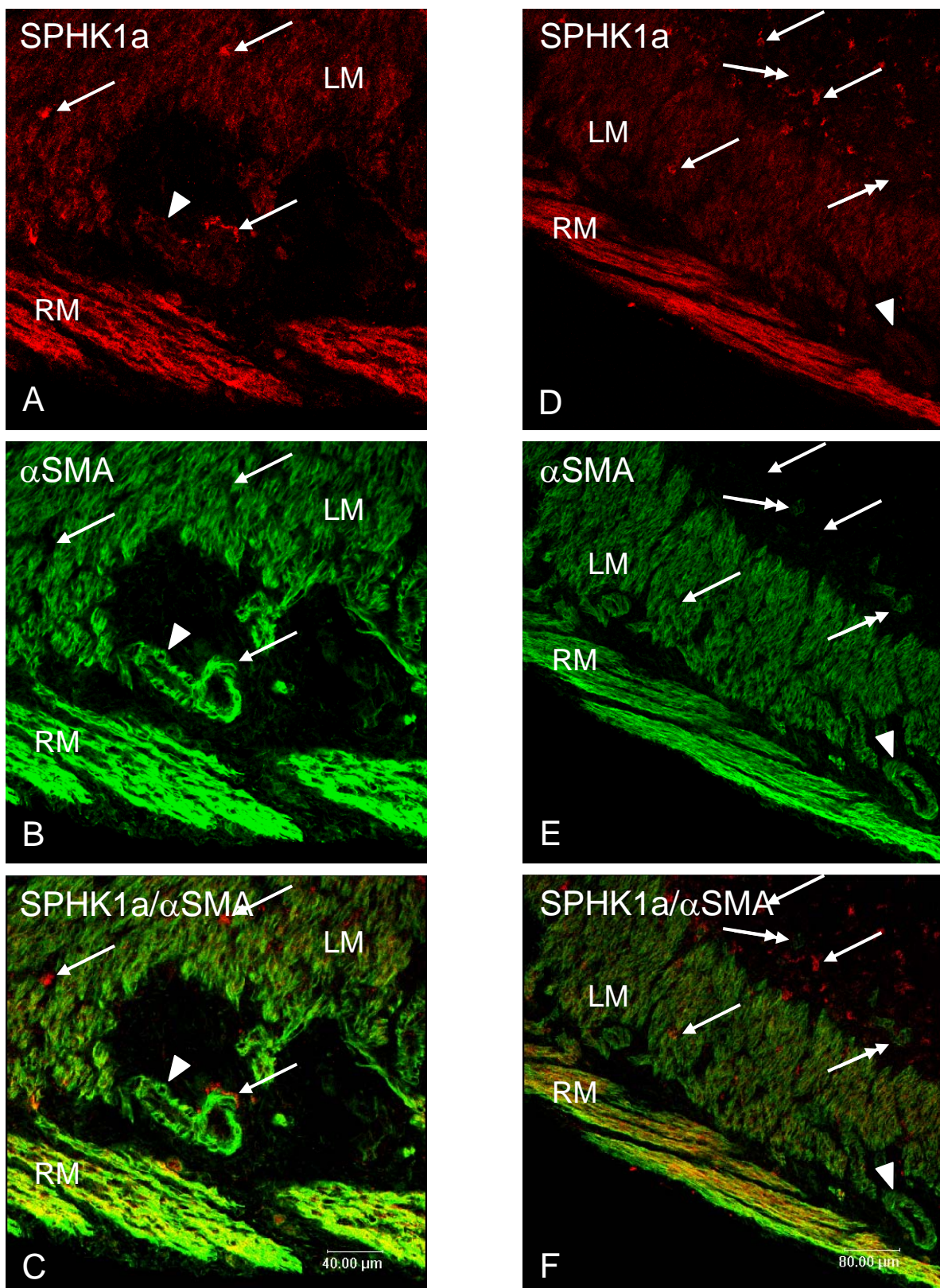


Abb. 57: Uterus, Myometrium

Die glatten Muskelzellen (B, E: RM, LM) im Myometrium des Uterus zeigen eine sehr starke SPHK1a-IR (A, D: RM, LM), wobei die äußere Ringmuskulatur (RM) eine stärkere IR als die innere längs gerichtete Muskelschicht (LM) besitzt. Die glatte Muskulatur der Gefäße (B, E: ►) weist eine starke SPHK1a-IR auf (A, D: ►). Im Interstitium sind vereinzelt SPHK1a-immunreaktive Zellen lokalisiert (A, D: →), die keine αSMA-IR besitzen (B, E: →). Die Spiralarterien (E: Doppelpfeil) im Endometrium zeigen keine SPHK1a-IR der glatten Muskulatur (D: Doppelpfeil).

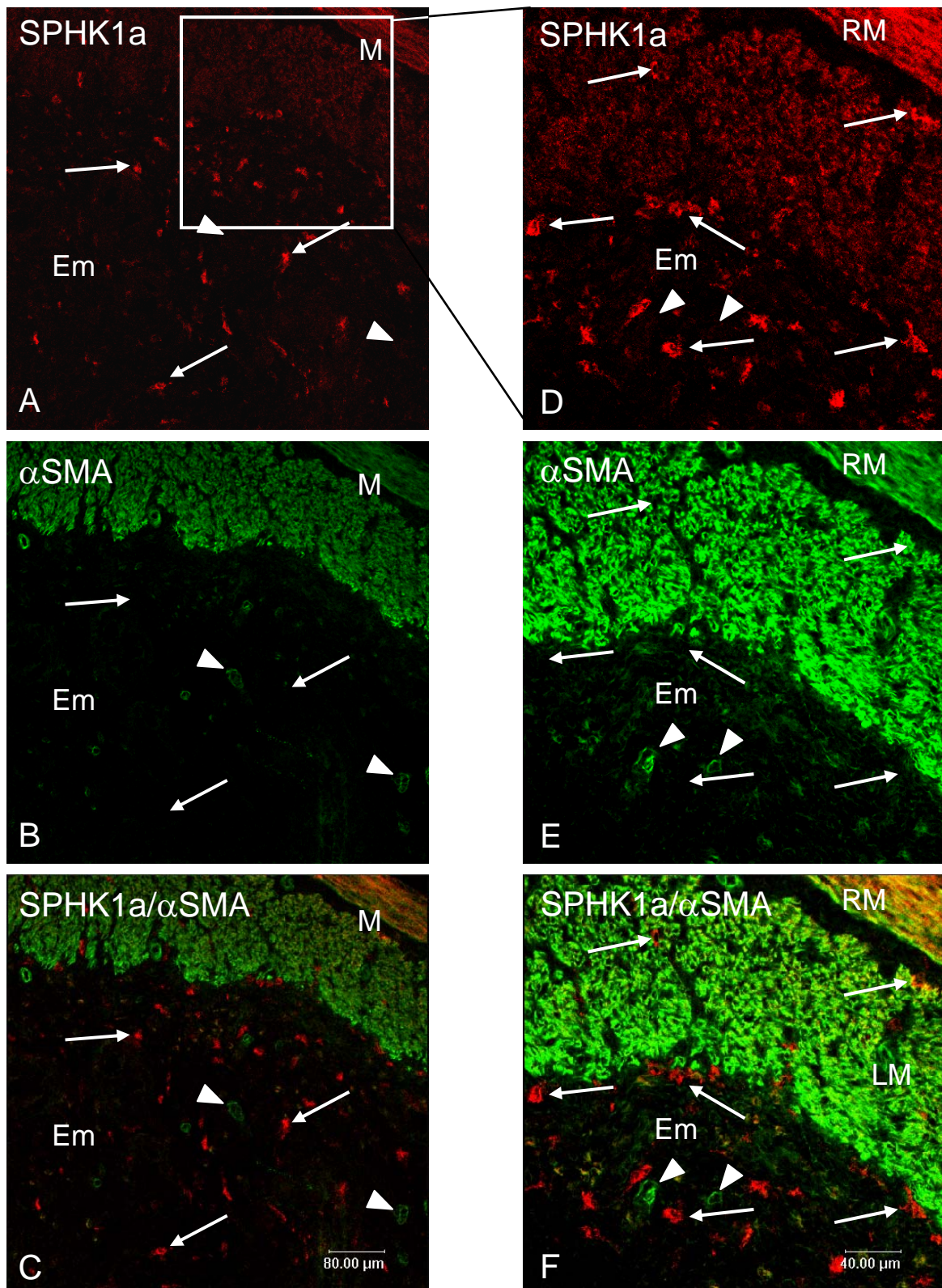


Abb. 58: Uterus, Endometrium

Die muskelschwachen Spiralarterien (B, E: ►) im Endometrium (Em) weisen keine SPHK1a-IR der glatten Muskulatur auf (A, D: ►). An der Myometrium-Endometrium-Grenze und um die Gefäße sind viele sehr stark SPHK1a-immunreaktive Zellen im Bindegewebe des Endometriums lokalisiert (A, D: →), die jedoch kein glattes Muskelzellaktin beinhalten (B, E: →). Vereinzelt sind diese Zellen auch im Bindegewebe zwischen der glatten Muskulatur im Myometrium zu finden. Die glatten Muskelzellen (B: M) zeigen eine sehr starke SPHK1a-IR im Myometrium (A: M), die Reaktivität der äußeren Ringmuskelschicht (RM) ist hierbei noch stärker als die der inneren Längsmuskulatur (LM) ausgebildet.

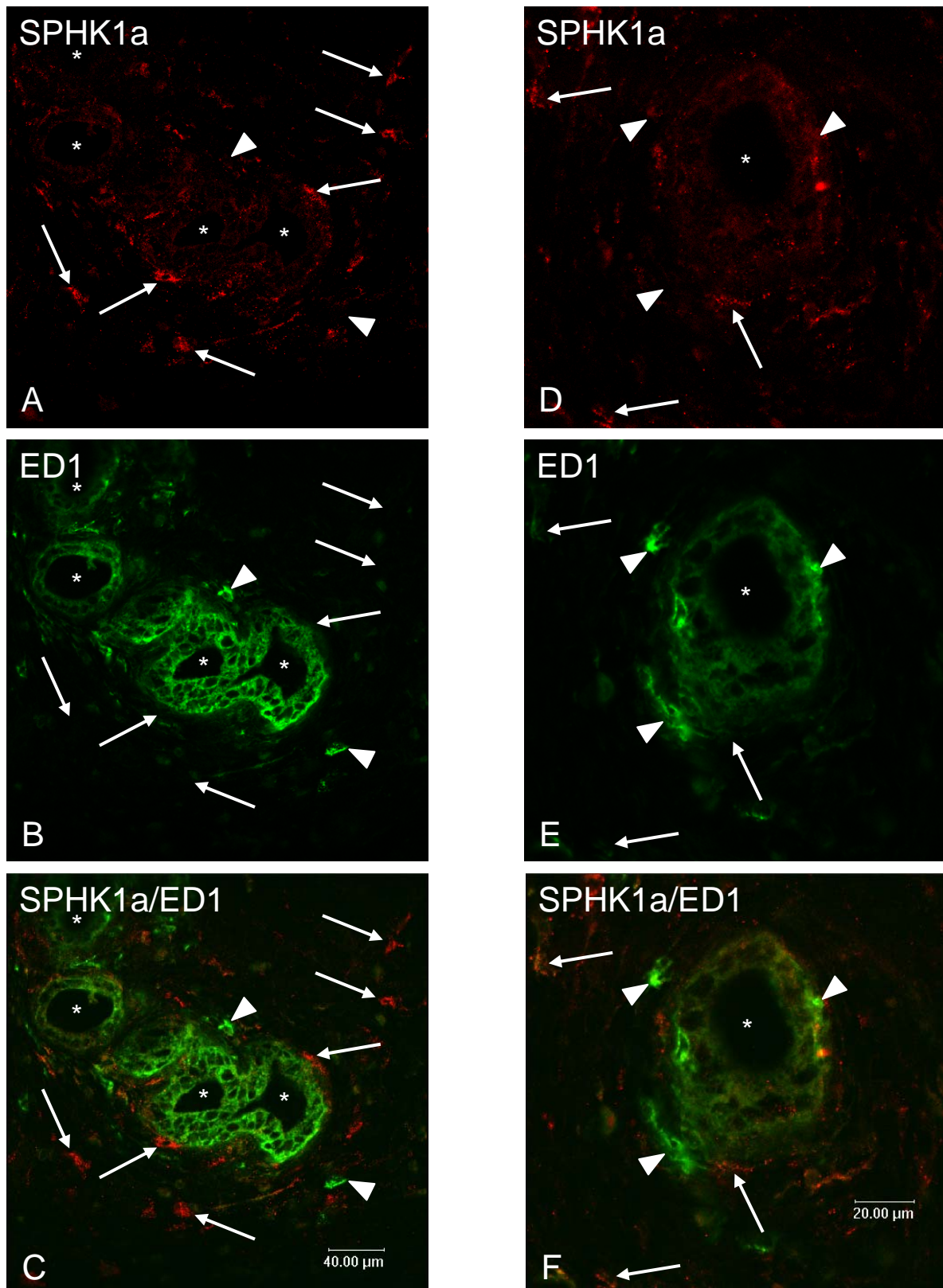


Abb. 59: Uterus, Doppelimmunfluoreszenz mit ED1-Antikörper

Im Uterus zeigen die Glandulae uterinae (*) keine SPHK1a-IR der Epithelzellen. Um die tubulären Drüsen sind einige SPHK1a-immunreaktive Zellen im Bindegewebe abzugrenzen (A, D: →), bei denen jedoch keine ED1-IR nachzuweisen ist (B, E: →). Weiterhin weisen im Endometrium einige Zellen eine ED1-IR (B, E: ▶) auf, zeigen aber keine Kolokalisation mit SPHK1a (A, D: ▶).

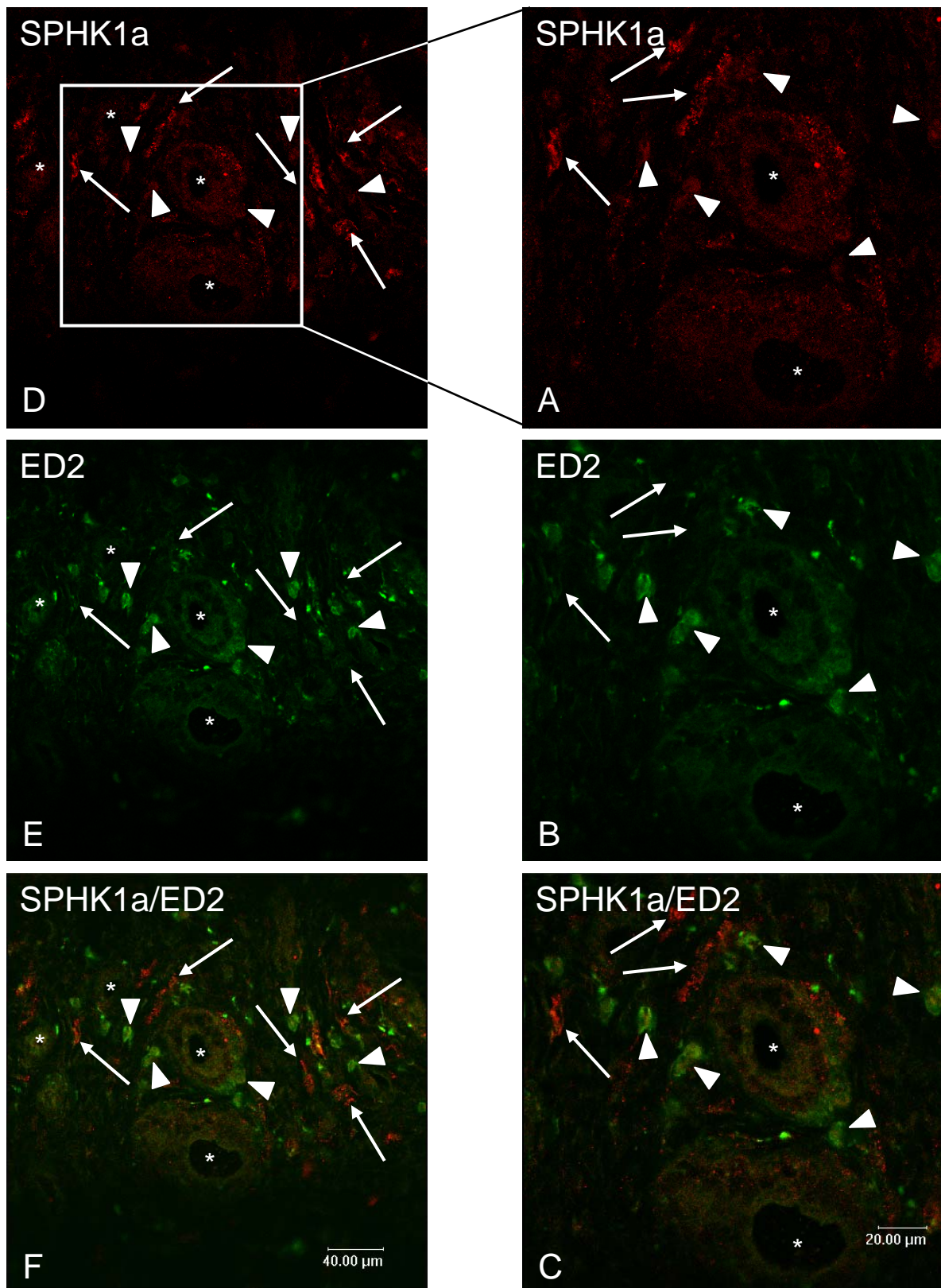


Abb. 60: Uterus, Doppelimmunfluoreszenz mit ED2-Antikörper

Die Epithelzellen der Glandulae uterinae (*) zeigen keine SPHK1a-IR. Im umgebenden Bindegewebe finden sich SPHK1a-immunreaktive Zellen (A, D: →), die keine ED2-IR besitzen (B, E: →). Des weiteren sind viele Zellen mit einer ED2- (B, E: ▶), aber ohne SPHK1a-IR (A, D: ▶) abzugrenzen. Es ist in keiner Zelle eine Kolokalisation festzustellen.

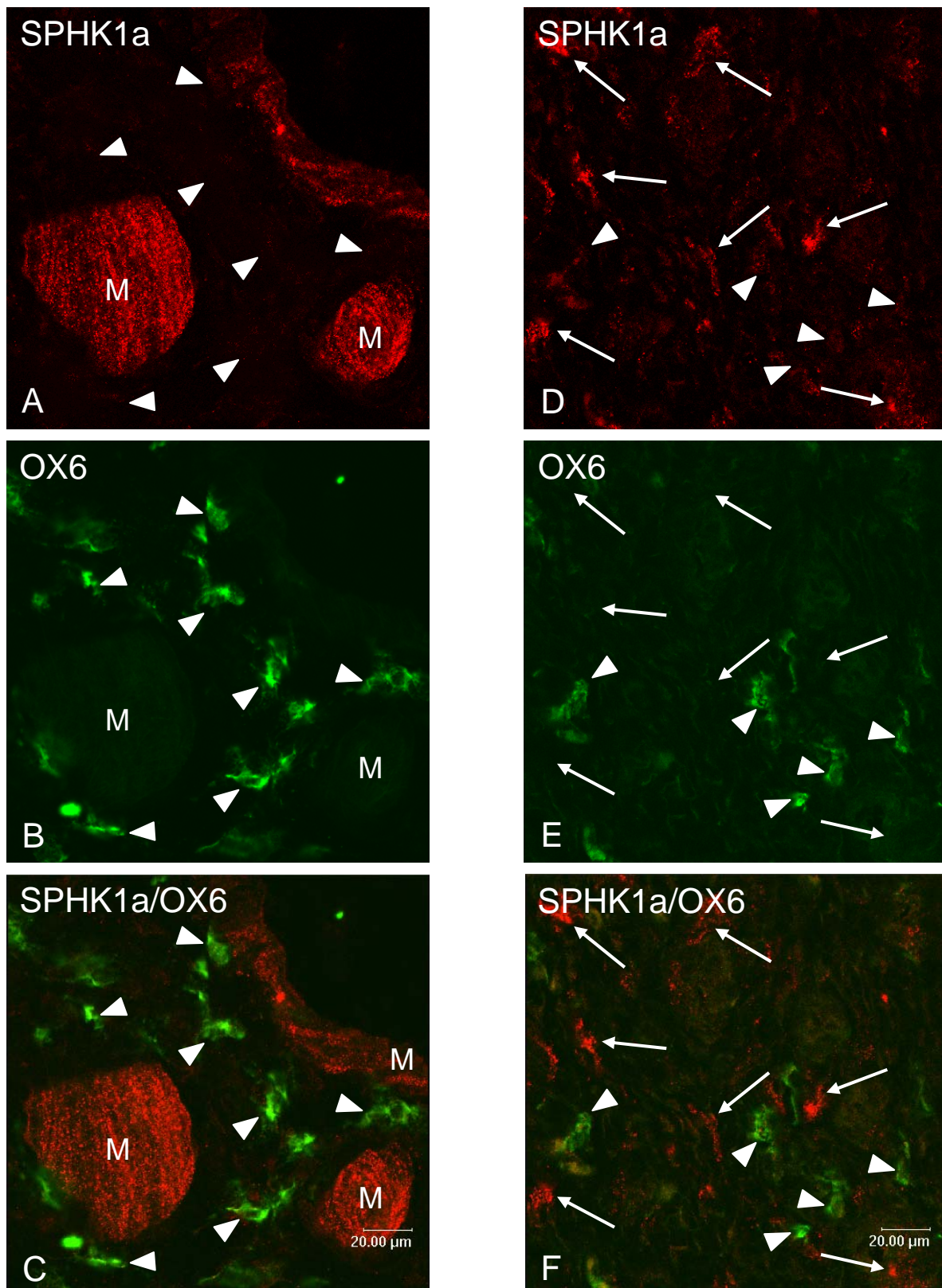


Abb. 61: Uterus, Doppelimmunfluoreszenz mit OX6-Antikörper

Die glatten Muskelzellen (B: M) weisen eine sehr starke SPHK1a-IR auf (A: M). Im Endometrium zeigen einige Zellen im Bindegewebe eine SPHK1a-IR (D: →), weisen aber keine OX6-IR auf (E: →). Des weiteren finden sich im Interstitium auch OX6-immunreaktive Zellen (B, E: ►), die keine SPHK1a-IR aufweisen (A, D: ►). Eine Kolokalisation der SPHK1a- und OX6-IR zeigt keine der reaktiven Zellen im Bindegewebe.

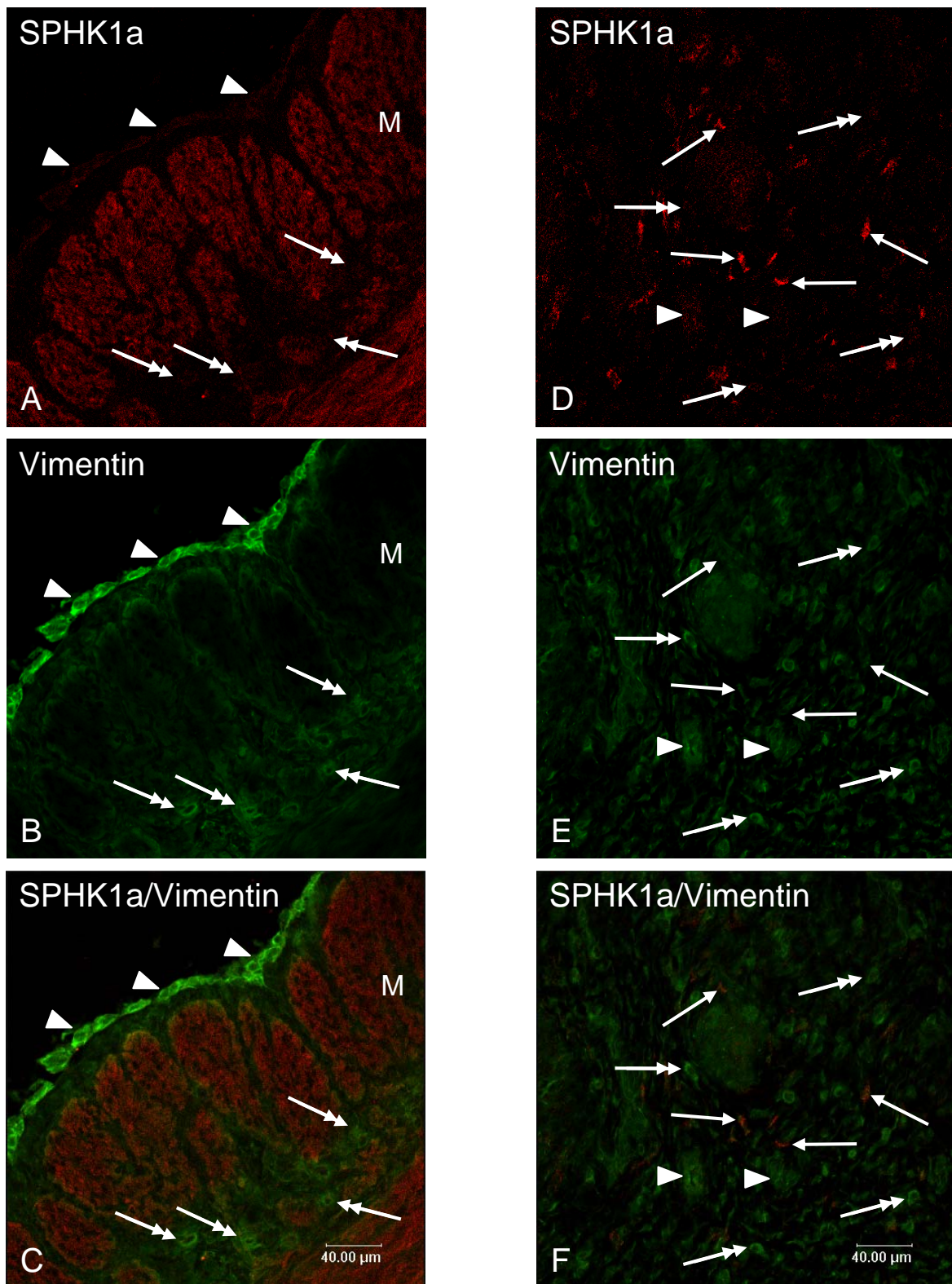


Abb. 62: Uterus, Myometrium, Endometrium mit Vimentin-SPHK1a-Doppelimmunfluoreszenz

Die glatten Muskelzellen im Myometrium weisen eine sehr starke SPHK1a-IR auf (A: M). Die zwischen den Bündeln glatter Muskelzellen gelegenen Bindegewebszellen zeigen eine Vimentin-IR (B, E: Doppelpfeil). Auch die Mesothelzellen des Uterus sind Vimentin-immunreaktiv (B: ►). Im Endometrium finden sich mehrere längliche SPHK1a-immunreaktive Zellen (D: →), die keine Vimentin-IR aufweisen. Jedoch findet sich bei keiner der verschiedenen immunreaktiven Zellpopulationen eine SPHK1a-Vimentin-Kolokalisation.

Nebenniere

Die glatte Muskulatur der Aa. suprarenales und deren Äste wiesen eine sehr starke SPHK1a-IR auf (Abb. 63). Bei den Arterien des subkapsulären Gefäßplexus konnte noch eine starke SPHK1a-IR der glatten Myozyten festgestellt werden (Abb. 63). Im Organinneren zeigten die vaskulären Muskelzellen der im Mark verlaufenden Äste der Vv. suprarenales eine nur geringe SPHK1a-IR und die fenestrierten Kapillaren wiesen keine SPHK1a-IR auf (Abb. 64). Die Untersuchung des Rindenparenchyms der Nebenniere ergab keine SPHK1a-IR der verschiedenen endokrinen Zellen der Zona glomerulosa, fasciculata und reticularis (Abb. 63). Im Nebennierenmark wiesen die adrenergen und noradrenergen chromaffinen Zellen und die sympathischen postganglionären Neurone keine erkennbare SPHK1a-IR auf (Abb. 64). Das umgebende retikuläre Bindegewebe und die medullären weitgestellten Kapillaren zeigten keine IR. Bei den vereinzelt in der Organkapsel lokalisierten glatten Muskelzellen konnte eine geringe SPHK1a-IR nachgewiesen werden (Abb. 63).

Tab. 19: SPHK1a-IR der Nebenniere

Gefäße	SPHK1a-IR		Anmerkungen
	Endothel	Tunica media	
▪ A. suprarenalis	-	+++	
▪ Subkapsuläre Arterien	-	++/+	
▪ V. centralis	-	+	
▪ Kapillarsinus	-	-	
Cortex glandulae suprarenalis			
Kapsel	+ ¹⁴		¹⁴ glatte Muskelzellen
Zona glomerulosa	-		
Zona fasciculata	-		
Zona reticularis	-		
Medulla glandulae suprarenalis			
chromaffine Zellen	-		
Sympathische Ganglien	-		

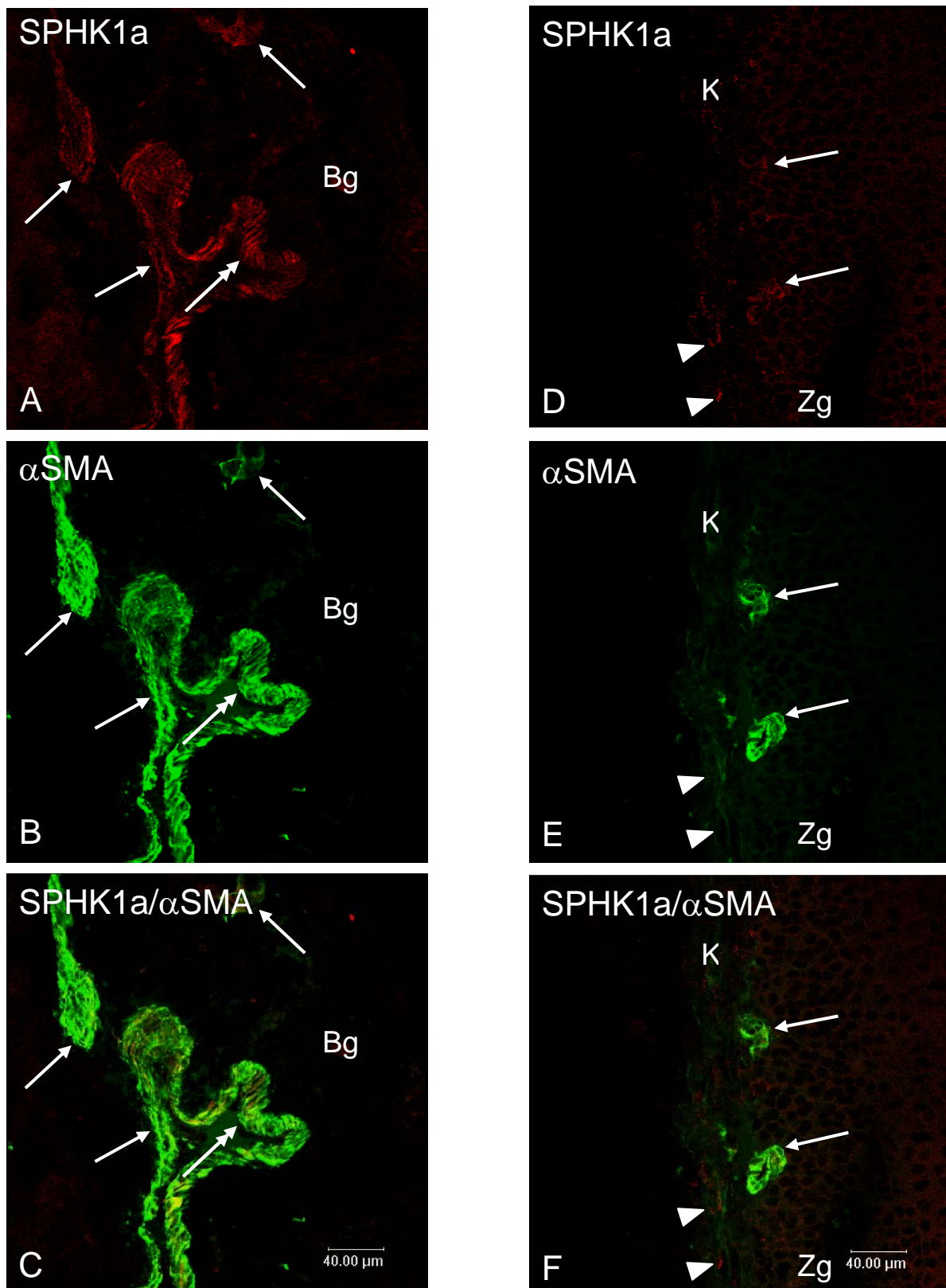


Abb. 63: Nebenniere, Blutgefäße

Die A. suprarenalis und die Gefäße des subkapsulären Plexus (B, E: →) zeigen eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen (A, D: →). Das Endothel (Doppelpfeil) und das umgebende Bindegewebe (Bg) lassen keine IR erkennen. In der Kapsel (K) sind einige SPHK1a-immunreaktive Strukturen und Zellen erkennbar (A, D: ►), die zum Teil nur eine sehr schwache αSMA-IR besitzen (B, E: ►). Das Parenchym der Zona glomerulosa (Zg) und der teilweise angeschnittenen Zona fasciculata (Zf) weist keine immunreaktiven Epithelzellen auf.

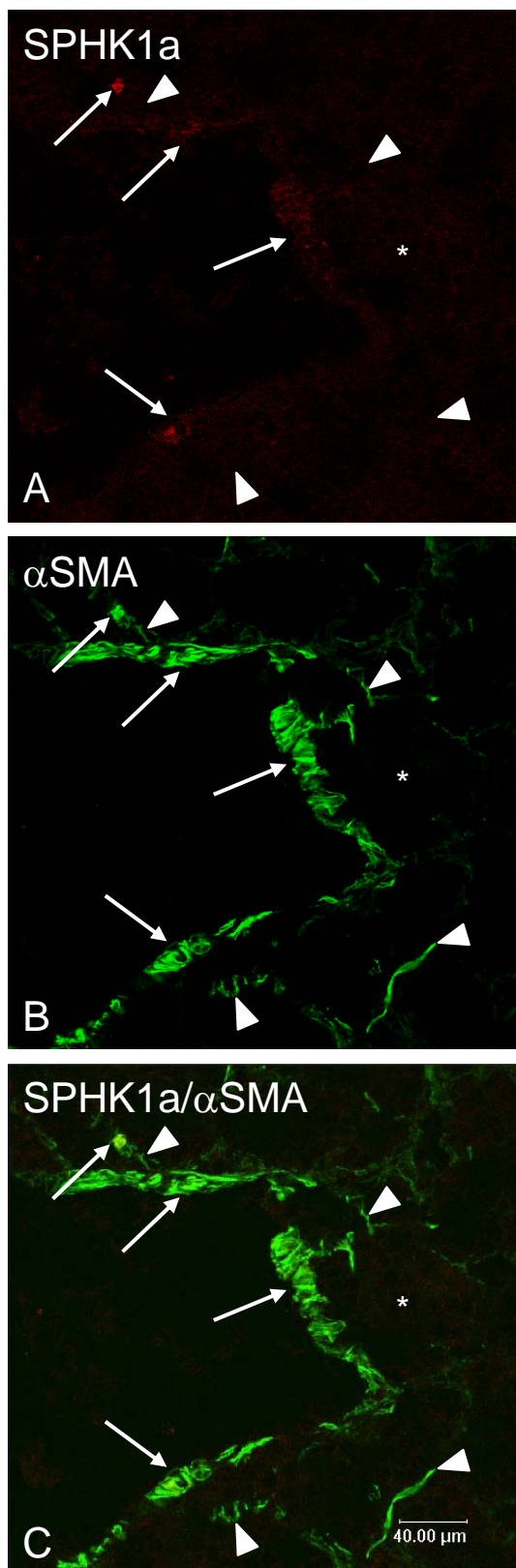


Abb. 64: Nebenniere, Medulla glandulae suprarenalis

In Mark der Nebenniere stellen sich die Äste der V. suprarenalis (B: \rightarrow) mit einer nur geringen SPHK1a-IR der Tunica media dar (A: \rightarrow). Die glatten Muskelzellen der kleineren Äste (B: \blacktriangleright) und die weitgestellten Kapillaren weisen keine SPHK1a-IR auf (A: \blacktriangleright). Beim umgebenden Parenchym (*) konnte keine SPHK1a-IR der verschiedenen medullären Zellpopulationen beobachtet werden.

Bewegungsapparat

M. biceps brachii

Die glatte Gefäßmuskulatur der A. und V. brachialis und deren Äste zeigte bis auf die Ebene der Arteriolen und Venolen eine sehr starke SPHK1a-IR (Abb. 65). Bei den präkapillären Arteriolen und Kapillaren konnte keine SPHK1a-IR festgestellt werden. Das Endothel und das gefäßumgebende Bindegewebe zeigten keine IR der Zellen oder Strukturen.

Die Skelettmuskulatur wies keine SPHK1a-IR auf (Abb. 65-67). Es wurden zwischen den Muskelfasern einige immunreaktive Strukturen nachgewiesen, die nicht α SMA-immunreaktiv waren (Abb. 66). Durch die Doppelimmunfluoreszenzen mit NF68, einem Marker für neuronale Strukturen, konnte eine enge topografische Beziehung der SPHK1a-immunreaktiven Strukturen zu den Nervenfasern, aber keine Kolo-kalisation, gezeigt werden (Abb. 67). Bei den SPHK1a-immunreaktiven Strukturen könnte es sich möglicherweise um Muskelspindeln des M. biceps brachii handeln, die SPHK1a-immunreaktive Fasern, wie z. B. die Kernketten- oder Kernhaufenfasern, beinhalten.

Bei den parallel zu der A. brachialis verlaufenden Nervenfaserbündeln des N. medianus konnte keine SPHK1a-IR festgestellt werden (Abb. 67).

Tab. 20: SPHK1a-IR des M. biceps brachii

Gefäße	SPHK1a-IR		Anmerkungen
	Endothel	Tunica media	
▪ Arterien	-	+++	
▪ Venen	-	+++	
M. biceps brachii			
Skelettmuskulatur	-		
vereinzelte Strukturen	++		
Neuronale Strukturen			
N. medianus	-		

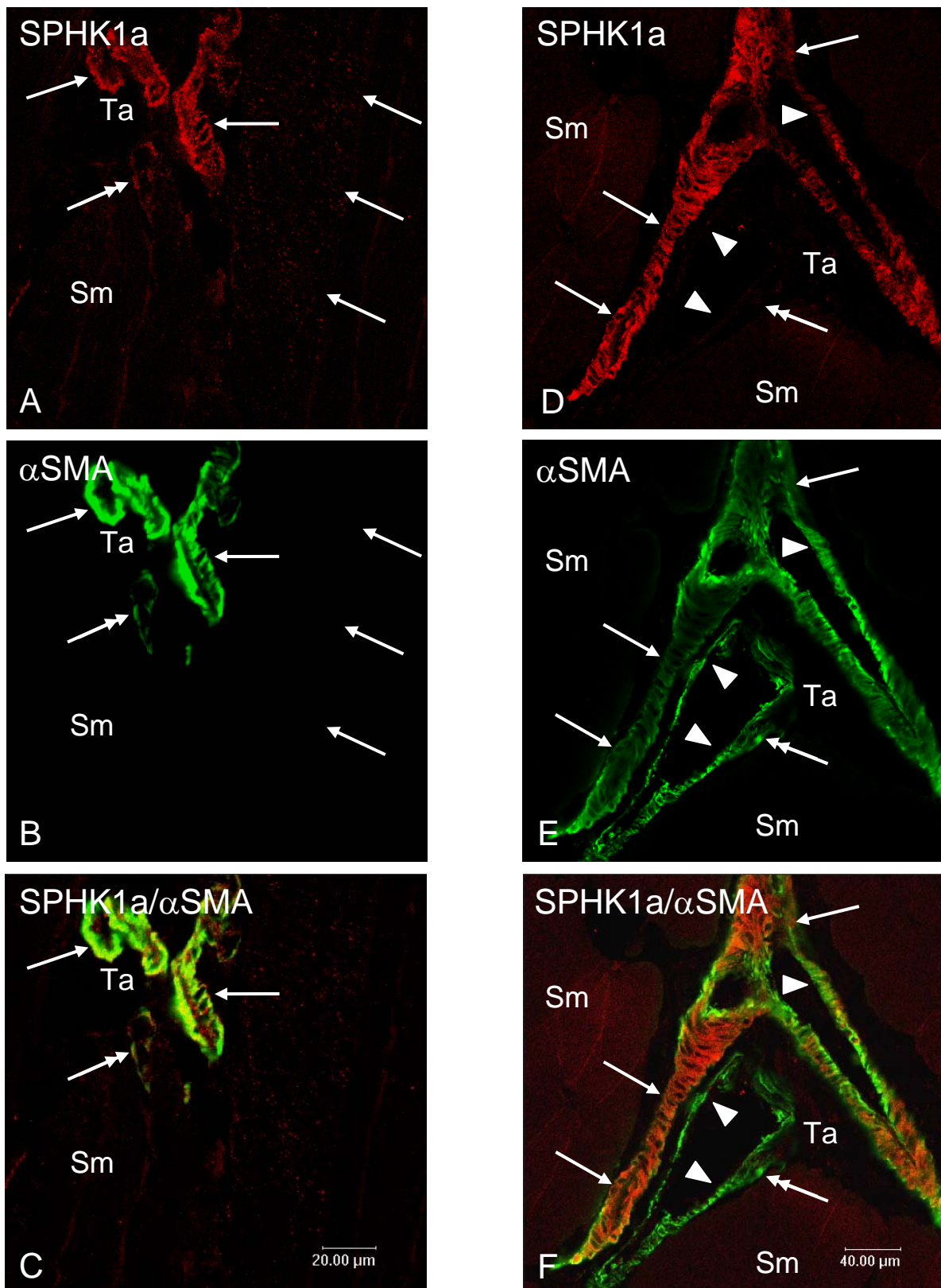


Abb. 65: M. biceps brachii, Arterien und Venen im Vergleich

Die Äste der A. brachialis (B, E: →) weisen eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen auf (A, D: →). Die glatte Muskulatur der begleitenden Vene (B, E: Doppelpfeil) zeigt bei gleich bleibender αSMA-IR eine deutlich geringere SPHK1a-IR (A, D: Doppelpfeil). Durch die nicht-reaktiven Nuclei lassen sich die einzelnen glatten Muskelzellen (B, E: →) in der Tunica media sehr gut abgrenzen (A, D: →). Die Tunica adventitia (Ta) und intima (▶) weisen keine immunreaktiven Zellen auf. Die Skelettmuskelfasern (Sm) zeigen keine SPHK1a-IR (A: *).

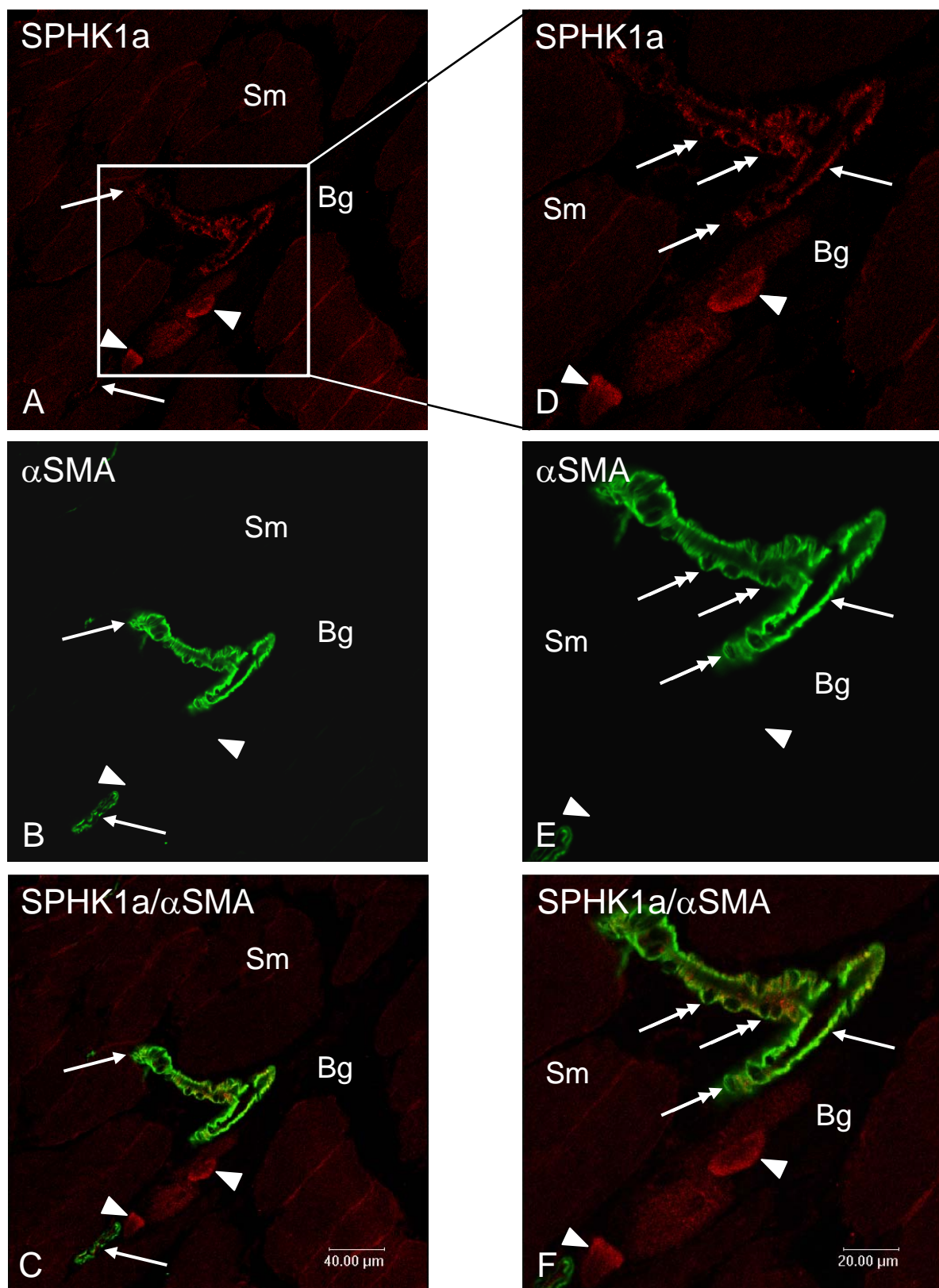


Abb. 66: M. biceps brachii, Blutgefäße

Die glatten Muskelzellen der Gefäße (B, E: →) weisen eine starke SPHK1a-IR auf (A, D: →). Durch die nicht-reaktiven Zellkerne sind einzelne Muskelzellen (Doppelpfeil) in der Tunica media abgrenzbar. Neben den Blutgefäßen im interstitiellen Bindegewebe (Bg) befinden sich Strukturen mit einer starken SPHK1a-IR (A, D: ►). Bei der umgebenden Skelettmuskulatur (Sm) lässt sich keine SPHK1a-IR beobachten.

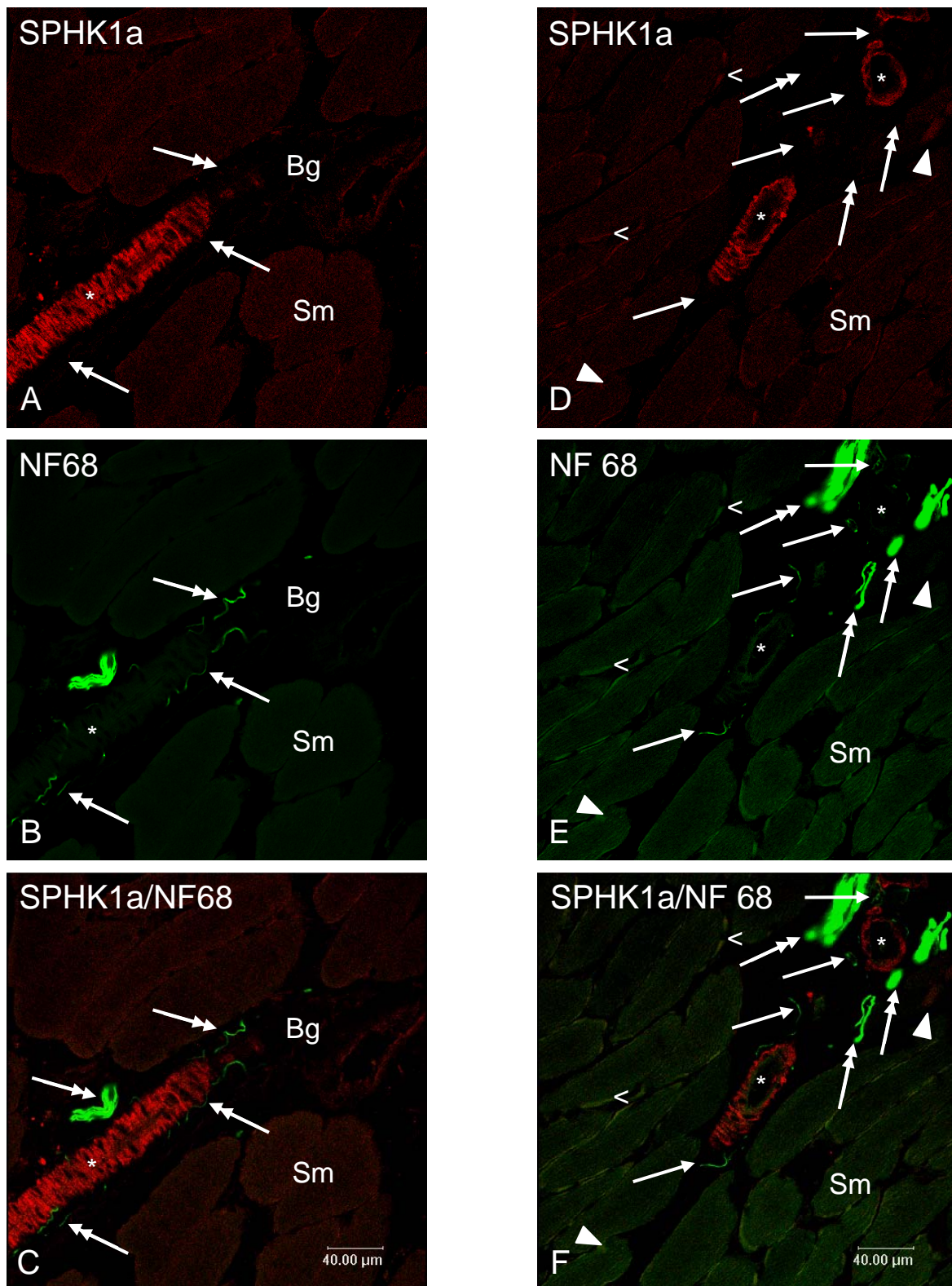


Abb. 67: M. biceps brachii, Blutgefäße mit SPHK1a-NF68-Doppelimmunfluoreszenz

Die Gefäße weisen eine starke SPHK1a-IR der Muskulatur auf (A, D: *). Die Endothelzellen und die Zellen des umgebenden Bindegewebes (Bg) zeigen keine SPHK1a-IR. Einige Strukturen zwischen den Skelettmuskelfasern zeigen eine SPHK1a-IR (D: ►), aber keine NF68-Kolokalisation (E: ►). Um die Gefäße und um die SPHK1a-immunreaktive Struktur stellen sich viele Nervenfasern mit NF68-IR dar (B, E: Doppelpfeil). Die umgebende Skelettmuskulatur (Sm) und das Endomysium (<) zeigen keine SPHK1a-IR. Die Skelettmuskulatur (Sm) zeigt keine SPHK1a-IR.

Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

- Die glatte Muskulatur nahezu aller Blutgefäße besitzt SPHK1a-Immunreaktivität.
- Die Intensität der SPHK1a-Immunfluoreszenz variiert abhängig vom Gefäßsystem: Arterien des Gehirns, Herzens, Darms, der Niere und des M. biceps brachii weisen eine stärkere Immunfluoreszenz der glatten Muskulatur auf als vergleichbare Gefäße in Trachea, Lunge, Leber, Uterus und der Vasa nervorum großer Nerven.
- Die Immunreaktivität der glatten Muskelzellen von Arterien ist im Vergleich zu der der venösen Gefäßmuskulatur deutlich stärker ausgebildet.
- Die SPHK1a-Immunfluoreszenz der glatten Gefäßmuskulatur nimmt zu den kleinen Gefäßen hin ab und ist bei den präkapillären Arteriolen nicht mehr nachweisbar.
- Die nicht-vaskuläre glatte Muskulatur, wie die Muskulatur der Atemwege, des Gastrointestinaltrakts, des Nierenbeckens und des Uterus, zeigt eine sehr starke SPHK1a-Immunreaktivität, die weit stärker ist als die der glatten Gefäßmuskulatur.
- Eine nicht-glattmuskuläre Immunreaktivität wurde nur in wenigen Bereichen von Uterus, Niere, Großhirn und Darm nachgewiesen.

4. Diskussion

Methoden

Die Voruntersuchungen zeigten eine Abhängigkeit der SPHK1a-IR in Bezug auf das untersuchte Gewebe und des verwendeten Fixativs. Beide Fixantien, Aceton und Isopropanol, zeigten bei guter Gewebekonservierung eine Erhaltung der IR und somit der antigenen Determinanten. Die Auswertung der mit den beiden Fixativen behandelten Parallelschnitte ergab eine – bis auf wenige Ausnahmen - identische Verteilung der SPHK1a-IR, obgleich Aceton-fixiertes Gewebe im Vergleich zu Isopropanol-fixiertem zum Teil eine stärkere IR sowohl der glattmuskulären als auch der nicht-muskulären SPHK1a-positiven Zellen aufwies. Weiterhin stellten sich bei Acetonfixierung im Vergleich zu Isopropanol-fixiertem Gewebe vor allem in der Niere, Leber und Zunge vermehrt vaskuläre SPHK1a-positive Zellen dar. Des Weiteren stieg die Anzahl der SPHK1a-immunreaktiven interstitiellen Zellen in der Aceton-fixierten Niere im Vergleich zur Isopropanol-Fixierung stark an.

Im Uterus zeigte sich eine fixierungsabhängiger Unterschied in der Detektion des SPHK1a-Proteins: Im Aceton-fixierten Uterus wiesen zahlreiche interstitielle Zellen eine sehr starke SPHK1a-IR auf, während diese Zellen im Isopropanol-fixierten Uterus nicht nachweisbar waren. Im Cerebrum zeigte sich ebenfalls ein fixierungsabhängiger Unterschied in der SPHK1a-IR des neuronalen Gewebes. In einigen Arealen des Isopropanol-fixierten Cerebrums zeigten Subpopulationen von Neuronen eine spezifische Reaktion, während in Parallelschnitten mit Aceton-Fixierung keine SPHK1a-positiven neuronalen Zellen identifiziert werden konnten.

Die fixierungsabhängigen Unterschiede der SPHK1a-IR in den Geweben Niere, Uterus und Gehirn könnte sich durch die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der SPHK1a erklären. Die SPHK1a kommt in Abhängigkeit vom Gewebe im Membrankompartiment oder im Zytosol vor (Baumruker et al., 2005). Daher ergibt sich die Möglichkeit, dass die SPHK1a bei einem vornehmlichen membranösen Vorkommen in den Geweben vermehrt ausgespült wurde und folglich immunhistologisch nicht mehr erfassbar war. Bei der Fixierung mit Aceton werden im Vergleich zu dem weniger aggressivem Isopropanol vermehrt Membranlipide ausgewaschen und somit bei membranständiger Lokalisation auch vermehrt SPHK1a. Durch die vermehrte Auswaschung zeigt das Gewebe in den immunhistochemischen Untersuchungen dementsprechend eine verringerte SPHK1a-IR.

Herz-Kreislauf-System

Blutgefäße

In in-vitro-Untersuchungen an definierten Zelllinien wurden durch In-Situ-Hybridisierung und pharmakologische Untersuchungen sowohl in Endothelzellen (transfizierte human umbilical vein cells (HUVEC), human vascular endothelial cell (HVEC)), in embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney cells (HEK 293T)), als auch in glatten Muskelzellen verschiedener Arterien SPHK-mRNA bzw. Isoformen der SPHK nachgewiesen (Augé et al., 1999; Xia et al., 1999; Ren et al., 2002; Xu et al., 2002). Die Lokalisation der SPHK1a wurde immunhistochemisch durch Murate et al. (2001) untersucht. Die SPHK1a konnte in fast allen Gefäßendothelzellen der untersuchten humanen Gewebe nachgewiesen werden. Im Hoden zeigten neben den Endothelzellen auch die glatten Muskelzellen eine SPHK1a-IR.

Die Ergebnisse bisher veröffentlichter Studien stimmen nur teilweise mit denen der hier vorliegenden immunhistochemischen Untersuchung überein: Die vaskulären Endothelzellen wiesen in keinem der untersuchten Gefäßgebiete eine SPHK1a-IR auf. Jedoch konnte ein ubiquitäres Vorkommen der SPHK1a in der glatten Gefäßmuskulatur nachgewiesen werden, obgleich auch einige Unterschiede zwischen verschiedenen Gefäßabschnitten in Intensität und/oder Verteilungsmuster der SPHK1a-IR erkennbar waren.

Im Allgemeinen wies im gleichen Gefäßgebiet die Tunica media der Arterien im Vergleich zu den begleitenden Venen eine stärkere SPHK1a-IR auf. Die Blutgefäße muskulären Typs und die peripheren muskelstarken kleineren Arterien zeigten im Vergleich zu den Gefäßen elastischen Typs eine stärkere SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen. Die Gefäße muskulären Typs und die kleineren Arterien wiesen eine äußerst starke IR ihrer gesamten Tunica media auf, während bei den Blutgefäßen elastischen Typs die äußeren Muskelzellschichten im Vergleich zu den Intima-nahen Zellschichten eine stärkere SPHK1a-IR besaßen. Die SPHK1a-IR der Media nahm mit dem Gefäßdurchmesser ab. Bei den präkapillären Arteriolen war keine SPHK1a-IR der Tunica media mehr nachzuweisen. Zudem fanden sich sowohl in Arterien als auch in Venen einige wenige SPHK1a-negative glatte Muskelzellen. Diese Myozyten waren vornehmlich in den inneren Muskelzellschichten der Tunica media lokalisiert und besaßen Kontakt zur Membrana elastica interna. Die mit Isopropanol fixierte Aorta thoracica zeigte hierbei insgesamt einen deutlichen Unterschied der SPHK1a-IR der glatten Gefäßmuskulatur. Die SPHK1a-IR der Tunica media nahm zentrifugal deutlich zu.

Die Unterschiede in der IR und somit wahrscheinlich in der Expression lassen sich durch die unterschiedliche Funktionszustände der Muskeln erklären. Die Myozyten der Tunica media stellen keine homogene Gruppe dar, sondern es gibt verschiedene Phänotypen: metabolische, kontraktile und ferner, da sie ineinander umwandelbar sind, noch alle denkbaren Zwischenstufen (Walker et al., 1986). Da beide Formen kontraktile Elemente, allerdings in unterschiedlicher Gewichtung, enthalten, sind sie beide α SMA-positiv (Owens, 1995). Die Differenzierung in die unterschiedlichen Myozytentypen sind u. a. von den Umgebungsbedingungen abhängig (Rzucidlo et al., 2007). Die kontraktilen Myozyten sind in der Lage, durch Dedifferenzierung in die metabolische Form überzugehen und in den subintimalen Raum zu wandern (Rzucidlo et al., 2007). Die SPHK1a spielt bei der Gefäßkontraktion und der Regulation des α -tonus eine wichtige Rolle (Xu et al., 2004) und könnte daher hauptsächlich im kontraktilen und weniger im metabolischen Phänotyp lokalisiert sein. Dies könnte die Präferenz der SPHK1a in den äußeren Muskelzellschichten der Tunica media erklären.

Die präkapillären Arteriolen verfügen neben den glatten Muskelzellen und Perizyten auch über verschiedene Übergangsformen zwischen diesen Zellarten (Nehls und Drenckhahn, 1991). Die Perizyten der Mittkapillaren enthalten, im Gegensatz zu den Übergangsperizyten und Myozyten, keine kontraktile Elemente und unterscheiden sich auch biochemisch von den Myozyten (Benninghoff und Drenckhahn, 2004b). In dieser Arbeit wiesen viele der präkapillären Arteriolen eine α SMA-IR auf, waren aber SPHK1a-negativ. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Zellen der Übergangsformen, die zwar Aktin, aber keine SPHK1a enthalten.

Die Unterschiede in der Intensität der SPHK1a-IR in verschiedenen Gefäßabschnitten lassen sich durch die Beeinflussung der myogenen Reaktion der glatten Muskelzellen durch die SPHK1 erklären (Bolz et al., 2003). Der vermehrte Gehalt an SPHK1 erhöht die Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktile Elemente und führt zu einer Verstärkung der myogenen Zellantwort und des Gefäßtonus (Bolz et al., 2003). Die glatten Muskelzellen der Gefäße elastischen Typs modulieren nur die Vorspannung der Elastinlamellen und daher ist eine sehr hohe Kontraktilität der Myozyten bzw. eine hohe SPHK1-Konzentration nicht notwendig. Im Gegensatz dazu zeigen die Blutgefäße des muskulären Typs, die den peripheren Gefäßwiderstand regulieren und daher sehr hohe Wandspannungen erzeugen müssen, einen hohen Gehalt an SPHK1a.

Der hohe Gehalt an SPHK1a spricht für eine vermehrte intrazelluläre S1P-Synthese (Olivera et al., 1999). S1P ist in der Lage, als intrazellulärer second messenger verschiedene Regelmechanismen zu beeinflussen. So könnte S1P-abhängig durch eine gesteigerte Entleerung intrazellulärer Speicher die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle erhöht und somit eine gesteigerte Kontraktilität der Myozyten bewirkt werden. Dass S1P zu einer gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung führt, zeigen Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen (Alewijns et al., 2004). Zudem könnte S1P auch durch vermehrtes Zellwachstum (Spiegel und Milstien, 2003) und/oder Steigerung der Proliferation (Xu et al., 2002) die Kontraktionskraft der Gefäße modulieren.

Während die Ca^{2+} -abhängigen Prozesse durch die second-messenger Wirkung des S1P gesteuert werden, ist auch eine autokrine oder parakrine Funktion der SPHK1/S1P denkbar (Hobson et al., 2001). Von verschiedenen nicht-vaskulären Zellen, wie HEK293 Zellen (Johnson et al., 2002), hämatopoetische Zellen und Mastzellen (Yatomi et al., 2000; Olivera et al., 2006), wird S1P freigesetzt. Die Myozyten könnten direkt durch Freisetzung von S1P oder indirekt durch die Sekretion von SPHK1 die extrazelluläre S1P-Konzentration erhöhen. Ancellin et al. (2002) konnte die Freisetzung von SPHK1 und die damit verbundene extrazelluläre Synthese von S1P bei Endothelzellen nachweisen. S1P wirkt extrazellulär als Ligand an S1P-Rezeptoren und kann in verschiedenen Zellen wichtige biologische Prozesse beeinflussen. S1P ist in der Lage, je nach Gefäßgebiet und Konzentration eine Vasokonstriktion oder –dilatation auszulösen (Watterson et al., 2005) und könnte somit eine essenzielle Rolle in der Regulation des lokalen Blutflusses spielen.

Die Dysregulation der S1P-vermittelten Prozesse in den glatten Gefäßmuskelzellen sowie in den Endothelzellen (Yatomi et al., 2000) steht in Zusammenhang mit der Pathogenese verschiedener Gefäßerkrankungen wie Hypertension, Arteriosklerose (Ross et al., 1993) und peripherer Gefäßerkrankungen (Radeff-Huang et al., 2004). Zum genauen Verständnis dieser Mechanismen bedarf es jedoch noch viel an weiterer Forschungsarbeit.

Herz

Verschiedene Northern Blot- (Kohama et al., 1998; Melendez et al., 2000; Liu et al., 2000) und Enzymaktivitätsuntersuchungen (Fukuda et al., 2003) an Gewebehomogenaten wiesen

SPHK1 in humanen und murinen Herzen nach. Auch wurde durch verschiedene Untersuchungen (u. a. massenspektroskopisch) das Syntheseprodukt der SPHK1a, S1P, in Homogenaten von Ratten-Herzen nachgewiesen (Van Veldhoven et al., 1994; Yatomi et al., 1997b). Weiterhin konnte die mRNA der SPHK2 in Gewebekomogenaten von humanen und Mäuse-Herzen durch Northern-Blot-Studien in mäßiger Konzentration nachgewiesen werden (Liu et al., 2000). Die immunhistochemischen Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigten das Vorkommen der SPHK1a im Herzen und zeigten erstmals die zellspezifische Lokalisation des Enzyms.

Im Herzen zeigten sowohl die glatten Muskelzellen der Gefäße als auch die Myozyten im Stratum subendotheliale eine starke SPHK1a-IR. Die Koronargefäße besaßen im Vergleich zu anderen Gefäßgebieten eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen. In den atrialen und ventrikulären kardialen Myozyten konnte das Protein der SPHK1a immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte auch das Reizleitungssystem des Herzen keine SPHK1a-IR.

Zusammenfassend scheint die SPHK1a im Herzen im Wesentlichen auf die glatte Muskulatur beschränkt vorzuliegen. Die intrazelluläre SPHK1a könnte über die S1P-Synthese (Cavalli et al., 2002) durch Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Filamente eine Steigerung der Kontraktion bewirken (Bolz et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit der Kontraktionssteigerung durch S1P wäre die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder durch Einstrom über L-Kanäle (Nakajima et al., 2000; Liu und Kennedy, 2003b; Relling et al., 2003). Die SPHK1a bzw. S1P könnte auch parakrin oder autokrin wirken und so die Kontraktilität der umgebenden Myozyten beeinflussen, denn S1P_{1-3} -Rezeptoren konnten in großer Menge im Ratten-Herzen nachgewiesen werden (Nakajima et al., 2000; Liliom et al., 2001). Die glatten Muskelzellen der humanen Koronargefäße besitzen nur den S1P_3 -Rezeptor und die kardialen Endothelzellen den S1P_1 -Rezeptor (Mazurais et al., 2002). Die S1P-Rezeptoren sind für die Kontraktion der Koronargefäße nach intravasaler Applikation von S1P verantwortlich (Sugiyama et al., 2000b; Ohmori et al., 2003). Dem reduzierten koronaren Blutfluss folgt ein geringer negativer inotroper Effekt der Herzmuskulatur (Sugiyama et al., 2000b; Liu und Kennedy, 2003b). Extrazelluläres S1P wirkt auch auf die Kardiomyozyten, da Studien auch bei den Kardiomyozyten verschiedene S1P-Rezeptorsubtypen nachweisen konnten (Himmel et al., 2000), zusätzlich könnten die Kardiomyozyten die Fähigkeit zur S1P-Sekretion besitzen, wie dies schon bei verschiedenen anderen Zellarten nachgewiesen wurde (Yatomi et

al., 1997a). Insgesamt deuten die verschiedenen Untersuchungsergebnisse auf eine parakrine bzw. autokrine Wirkungsweise des S1P im Herzen hin. Nebenbei konnte im Gegensatz zu anderen Studien, die über eine Bradykardie nach S1P-Gabe berichteten (Sugiyama et al., 2000a; Benediktsdottir et al., 2002; Friedrichs et al., 2002; Forrest et al., 2004; Sanna et al., 2004), eine Steigerung der Herzfrequenz festgestellt werden (Sugiyama et al., 2000b). Die differierende kardiovaskuläre Wirkung von S1P könnte sich durch die unterschiedlichen Spezies, Applikationsmethoden oder die S1P-Konzentrationen erklären.

Weitere Untersuchungen zeigten einen protektiven Effekt des extra- und auch intrazellulärem S1P auf kardiale Myozyten und Fibroblasten unter Hypoxie bzw. Ischämie (Karliner et al., 2001; Jin et al., 2001, 2002, 2004; Lecour et al., 2002). Da sowohl intra- als auch extrazelluläres S1P kardioprotektiv wirkt, sollte es sich hierbei um eine auto- und parakrine Wirkung des S1P handeln. Extrazelluläres S1P könnte über S1P-Rezeptoren in Kardiomyozyten noch nicht identifizierte Mechanismen einleiten, die die Myozyten bei Ischämie und Hypoxie schützen (Jin et al., 2002 und 2004). Untersuchungen konnten verschiedene S1P-Rezeptoren in den Herzmuskelzellen nachweisen (Himmel et al., 2000). Ferner wäre auch eine Interaktion mit den Endothelzellen denkbar, da auch die Endothelzellen der Koronargefäße über S1P-Rezeptoren verfügen (Yatomi et al., 2000; Mazurais et al., 2002; Salomone et al., 2003). Das exogene S1P könnte über Beeinflussung verschiedener Regelmechanismen, wie Angiogenese, Permeabilität, Migration und Proliferation (Hla et al., 2001; Panetti et al., 2002), das Gewebe im ischämischen Gefäßgebiet schützen und/oder die Regeneration der geschädigten Zellen zu fördern. Es bedarf jedoch noch viel an weiterer Forschungsarbeit, um die S1P-Signaltransduktionswege innerhalb und außerhalb der Zelle zu identifizieren und dadurch die kardioprotektiven Mechanismen zu verstehen.

Unterer Respirationstrakt

S1P wurde in verschiedenen Homogenat-Untersuchungen in Ratten-Lungen nachgewiesen (Yatomi et al., 1997b). Northern Blot- und Enzymaktivitätsstudien von Homogenaten beschrieben später eine ausgeprägte Präsenz von SPHK1 in humanen und Mäuse-Lungen (Kohama et al., 1998; Melendez et al., 2000; Fukuda et al., 2003), während Liu et al. (2000) durch Northern Blot-Untersuchungen nur eine mäßige Konzentration von SPHK1 und eine sehr geringe Konzentration von SPHK2 in Mäuse-Lungen nachweisen konnte. In humanen Lungenhomogenaten konnte durch Northern-Blot-Untersuchungen eine mäßige Expression der SPHK2-mRNA festgestellt werden (Liu et al., 2000). Die immunhistochemische Untersuchung des humanen Lungengewebes zeigte eine moderate SPHK1a-IR des Gefäßendothels und der submukösen Bronchialdrüsen, wohingegen die Alveolen keine SPHK1a-IR aufwiesen (Murata et al., 2001). Diese Untersuchungsergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da sich die SPHK1a-IR in Ratten-Lungen auf die glatte Bronchial- und Gefäßmuskulatur beschränkte. Dabei wies die glatte Muskulatur der Bronchien im Vergleich zu den vaskulären Myozyten eine deutlich stärkere SPHK1a-IR auf. Dass die SPHK1a nicht per se in myoiden Zellen vorkommt, zeigte die fehlende bzw. sehr geringe IR in Myoepithelzellen der Trachealdrüsen. Zwischen den SPHK1a-negativen Epithelzellen der seromukösen Drüsen konnten vereinzelt SPHK1a-immunreaktive Zellen lokalisiert werden. Aufgrund der Morphologie und basalen Lokalisation im Drüsenepithel handelt sich hierbei wahrscheinlich um Basalzellen. Der Gehalt an SPHK1a in den Basalzellen könnte auf die erhöhte Mitoseaktivität der Zellen zurückzuführen sein (Junqueira und Carneiro, 1996; Shu et al., 2002), da stimulierte SPHK1 S1P-vermittelt zu einer Steigerung der Proliferation und DNA-Synthese führt (Berse et al., 1992; Hosford et al., 2003).

Der hohe SPHK1a-Gehalt der glatten Muskulatur könnte im Zusammenhang mit einer parakrinen Regulation der Atemwegsdurchmesser stehen. Durch die SPHK1a intrazellulär synthetisiertes S1P könnte von den bronchialen Muskelzellen sezerniert werden und extrazellulär als Ligand an S1P-Rezeptoren die Kontraktion der Bronchialmuskulatur stimulieren (Watterson et al., 2005). Ferner besteht auch die Möglichkeit einer intrazellulären Wirkung von S1P auf die glatten Muskelzellen der Atemwege, so zeigten Pfaff et al. (2005), dass S1P in die Signalkaskade der muskarnischen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR)-vermittelten Regulation peripherer Atemwege integriert ist. Neben Stimulation der

Bronchialkontraktion induziert S1P auch die Proliferation von glatten Muskelzellen der Atemwege (Pyne et al., 1996; Ediger und Toews, 2000) und die Synthese von Stressfasern in HASM (human airway smooth muscle)-Zellen (Rosenfeldt et al., 2003). In asthmatisch veränderten Bronchien/Lungen ist durch die vermehrte S1P-Freisetzung aus aktivierten Mastzellen (Prieschl et al., 1999) die S1P-Menge im Lungengewebe stark erhöht (Ammit et al., 2001). Die Mastzellen sind vornehmlich in der Bronchialwand lokalisiert und könnten daher die glatten Muskelzellen und Endothelzellen parakrin stimulieren (Jolly et al., 2001). Die Dysregulation des S1P könnte so nicht nur zu einem Remodelling der Bronchialwand, sondern auch zu einer Stimulierung der Mastzelldegranulation und damit zu einer Verstärkung der immunologischen Antwort führen. SPHK-Inhibitoren zeigten eine Inhibition der IgE/antigenstimulierten Histamin-Sekretion (Jolly et al., 2001) und bilden ein neues Ziel in der Therapie des Asthma bronchiale.

Gastrointestinaltrakt

Intestinum

Das Syntheseprodukt der SPHK, S1P, konnte in hohen Konzentrationen im Dünndarm-Homogenat von Ratten und Mäusen nachgewiesen werden (Yatomi et al., 1997b, Fukuda et al., 2003). Eine Northern Blot-Untersuchung an humanem Dünndarm-Homogenat zeigte dort jedoch nur eine sehr geringe huSPHK1-Expression (Melendez et al., 2000), wohingegen die SPHK2 deutlich stärker exprimiert war (Liu et al., 2000). Die immunhistochemische Untersuchung des humanen Dünndarms bestätigte die geringe SPHK1-Konzentration auch auf Proteinebene, da nur epitheliale Zellen eine geringe SPHK1a-IR aufwiesen (Murate et al., 2001). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten im Gegensatz zu den Untersuchungen des humanen Intestinums von Murate et al. (2001) ein hohes Vorkommen der SPHK1a im Ratten-Dünndarm und ferner ein differentes Verteilungsmuster der SPHK1a-IR. Jedoch bestätigte die vorliegende Arbeit wiederum die durch Yatomi et al. (1997b) nachgewiesene hohe S1P-Konzentration im Ratten-Dünndarm. Die Diskrepanz der beiden immunhistochemischen Arbeiten könnte auf speziesspezifische Unterschiede im Verteilungsmuster der SPHK1a

beruhen, wie dies bei der Verteilung der S1P-Rezeptoren im kardiovaskulären System schon erkannt wurde (Karliner et al., 2002).

Die untersuchten Darmabschnitte (Ösophagus, Jejunum, Ileum) zeigten ein vergleichbares Verteilungsmuster der SPHK1a-IR. Die glatte Muskulatur, sowohl vaskulär als auch nicht-vaskulär, wies eine sehr starke SPHK1a-IR auf. Die Myozyten der Tunica media zeigten im Darm im Vergleich zu Gefäßgebieten anderer Organe eine starke SPHK1a-IR. Weiterhin zeigten einige Epithelzellen in den Glandulae intestinales eine sehr starke SPHK1a-IR. Da die Proliferation im Dünndarm in den Krypten stattfindet, könnte es sich um Stammzellen des intestinalen Epithels mit einer hohen Teilungsrate handeln. Das Vorkommen der SPHK1a in den Stammzellen wäre durch die hohe Mitoseaktivität dieser Zellen erklärbar, da die Stimulierung der SPHK1a zu einer Steigerung der Proliferation und DNA-Synthese in den Darmepithelzellen führen könnte. Untersuchungen an Swiss 3T3 Fibroblasten konnten neben einer Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration und morphologischen Veränderungen eine DNA-Synthese- und Proliferationssteigerung durch S1P nachweisen (Augé et al., 1999).

Die glatte Muskulatur der Gefäße zeigte eine starke SPHK1a-IR. Da die intrazelluläre SPHK1 in der Lage ist, die Kontraktilität vaskulärer Myozyten zu beeinflussen (Bolz et al., 2003), könnte sie an der Regulation des lokalen Gefäßwiderstands beteiligt sein. Zudem könnte die SPHK1a auch parakrin/autokrin (Ancellin et al., 2002) durch Regulierung der extrazellulären S1P-Konzentration auf den lokalen Blutfluss einwirken. Die Applikation von S1P führt je nach Konzentration zu einer Vasokonstriktion oder –dilatation im mesenterialen Gefäßgebiet, ohne jedoch den arteriellen Blutdruck oder die Herzfrequenz zu beeinträchtigen (Bischoff et al., 2000; Dantas et al., 2003).

Die S1P-induzierte Kontraktion der glatten Muskelzellen ist nicht auf Blutgefäße beschränkt, sondern wurde auch an Myozyten verschiedener innerer Organe, wie Atemwege (Rosenfeldt et al., 2003; Pfaff et al., 2005) und Magen (Zhou et al., 2004), nachgewiesen. Daher könnte auch die Kontraktion der SPHK1a-immunreaktiven Darmmuskulatur durch parakrine/autokrine Regulation der extrazellulären S1P-Konzentration gesteuert werden.

Zunge

In dieser Arbeit wurde erstmals die SPHK1a in der Zunge der Ratte nachgewiesen. Bislang wurden lediglich Untersuchungen über das Vorkommen der SPHK in der Skelettmuskulatur durchgeführt: Northern Blot- (Kohama et al., 1998; Melendez et al., 2000; Liu et al., 2000) und Enzymaktivitätsuntersuchungen (Fukuda et al., 2003) von Skelettmuskel-Homogenaten unterschiedlicher Spezies zeigten nur eine sehr geringe Expression bzw. Aktivität der SPHK1 und 2. Auch das Syntheseprodukt der SPHK1, S1P, konnte nur in geringen Konzentrationen in der Ratten-Muskulatur nachgewiesen werden (Yatomi et al., 1997b). Die vorliegende immunhistochemische Untersuchung der Ratten-Zunge zeigte eine SPHK1a-IR der glatten Gefäßmuskelzellen und einer Subpopulation der um die Glandulae sublinguales gelegenen Myoepithelzellen, während die Skelettmuskulatur der Zunge keine SPHK1a-IR aufwies.

Die unterschiedliche SPHK1a-IR der Myoepithelzellen könnte im Zusammenhang mit der Lokalisation im Organ stehen. Die sternförmigen Myoepithelzellen umfassen die Drüsenendstücke. Durch die enthaltenen Aktin- und Myosinfilamente sind die Myoepithelzellen kontraktile und können daher die sezernierenden Drüsenabschnitte zusammendrücken und unterstützen somit die Sekretion der Epithelzellen (Junqueira und Carneiro, 1996). Die Glandulae sublinguales sind gemischte Drüsen mit serösen und mukösen Drüsenanteilen. Das Sekret der serösen Drüsenabschnitte ist dünnflüssig, enzym- und proteinreich. Im Gegensatz dazu sezernieren die mukösen Epithelzellen einen zähflüssigen, enzymarmen Schleim (Junqueira und Carneiro, 1996). Die erhöhte Viskosität des mukösen Sekrets könnte den Transport in den Drüsenausführungsgängen erschweren und somit eine erhöhte Kontraktilität der Myozyten erfordern. Die Myozyten im Bereich der mukösen Drüsenabschnitte könnten somit im Vergleich zu den Myozyten der serösen Drüsenanteile mehr SPHK1a enthalten, da eine erhöhte intrazelluläre SPHK1-Konzentration die Ca^{2+} -Sensibilität der myogenen Filamente steigert und so zu einer Zunahme der Kontraktilität führt (Bolz et al., 2003). Weiterhin steigert S1P, synthetisiert durch die SPHK1a, die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und kann auch hierdurch die Kontraktilität der Myozyten erhöhen (Spiegel und Milstien, 2003). Eine weitere alternative Regulierung wäre eine Freisetzung von SPHK1a oder S1P aus den Myozyten mit reaktiver autokriner bzw. parakriner Steigerung der Kontraktilität (Ancellin et al., 2002).

Leber, Pankreas

Bereits 1994 wiesen Van Veldhoven et al. massenspektroskopisch eine niedrige S1P-Konzentration in der Ratten-Leber nach (Van Veldhoven et al., 1994). Zwei Jahre später wurde durch eine alternative S1P-Untersuchungsmethode (Yatomi et al., 1995) das geringe Vorkommen des Sphingolipids im Leber-Homogenat bestätigt (Yatomi et al., 1997). Weitere Studien, Enzymaktivitäts- (Fukuda et al., 2003) und Northern Blot-Untersuchungen (Kohama et al., 1998; Melendez et al., 2000; Liu et al., 2000), zeigten sowohl im Menschen als auch in der Maus eine geringe Konzentration von SPHK1 in der Leber, jedoch konnte die Isoform SPHK2 durch Northern-Blot-Untersuchungen von Liu et al. (2000) in sehr hohen Konzentrationen in der Leber des Menschen und der Maus nachgewiesen werden. Immunhistochemisch konnte die SPHK1a in der Leber des Menschen in den Endothelzellen der Sinusoide, jedoch nicht in den Hepatozyten nachgewiesen werden (Murate et al., 2001). Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigten ein davon differierendes IR-Verteilungsmuster bei der Ratte: Die verschiedenen Zellen des Leberacinus, Hepatozyten, Kupffer-Zellen und Endothelzellen der Sinusoide, sowie die Ductus interlobulares wiesen keine SPHK1a-IR auf, lediglich die glatten Muskelzellen des Blutgefäßsystems zeigten eine SPHK1a-IR. Die Myozyten der Aa. interlobulares waren im Gegensatz zu den Glattmuskelzellen der Venen sehr stark SPHK1a-immunreaktiv. Das unterschiedliche Verteilungsmuster der SPHK1a-IR in der Leber könnte auf speziesspezifische Unterschiede beruhen, wie dies schon bei der Verteilung der S1P-Rezeptoren im Herzkreislauf-System gezeigt wurde (Karliner et al., 2002).

Im Gegensatz zu den zahlreichen Studien bezüglich der SPHK-Vorkommen in der Leber untersuchte nur eine Studie die Enzymaktivität der SPHK im Pankreashomogenat (Fukada et al., 2003). Die ermittelte geringe Aktivität der SPHK im Mäuse-Pankreas stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, da auch immunhistochemisch im Ratten-Pankreas insgesamt nur eine geringe SPHK1a-IR nachgewiesen werden konnte. So wiesen nur die glatten Myozyten der Blutgefäße eine SPHK1a-IR auf und die exo- bzw. endokrinen Pankreasparenchymzellen zeigten keine SPHK1a-IR.

Die SPHK1a konnte im Parenchym der beiden Anhangsdrüsen des Verdauungstraktes nicht nachgewiesen werden und wird daher in den endokrinen und metabolischen Zellfunktionen der hepatischen und pankreatischen Zellen eine eher untergeordnete Rolle spielen. Im Gegensatz zum Parenchym der beiden Organe wiesen die glatten Gefäßmuskelzellen, v.a. der

Arterien, eine SPHK1a-IR auf und somit könnte die SPHK1a auch hier an der Regulation des lokalen Blutflusses beteiligt sein. Untersuchungen konnten auch in mesenterialen Blutgefäßen eine konzentrationsabhängige Wirkung von S1P auf den Muskeltonus zeigen (Bischoff et al., 2000; Dantas et al., 2003).

Nervensystem

Gehirn

Frühere Untersuchungen konnten mit unterschiedlichen Methoden S1P in Gehirn-Homogenaten von Ratten nachweisen (Van Veldhoven et al., 1994; Yatomi et al., 1997). Weiterhin gelang in den darauf folgenden Jahren der Nachweis sowohl der SPHK1 als auch der SPHK2 in Gehirn-Homogenaten verschiedener Spezies durch Enzymaktivitätsstudien (Fukuda et al., 2003) und Northern Blot-Untersuchungen (Kohama et al., 1998; Melendez et al., 2000; Liu et al., 2000). Die immunhistochemische Arbeit von Murate et al. wies neben der SPHK1a-IR der weißen Substanz des humanen Cerebrums und Cerebellums auch eine SPHK1a-IR des Nucleus ruber und der Pedunculi cerebri im Mittelhirn nach (Murate et al., 2001). Terada et al. (2004) untersuchte immunhistochemisch die Verteilung der SPHK1a im Cerebellum von Mäusen und konnte bei einer Subpopulation der Purkinje-Zellen, insbesondere bei den Dendriten und der Plasmamembran, eine SPHK1a-IR nachweisen. In der vorliegenden Untersuchung zeigte das Ratten-Gehirn im Vergleich zum humanen und auch zum Mäuse-Gehirn ein unterschiedliches Verteilungsmuster der SPHK1a-IR: Im Aceton-fixierten Gewebe konnte weder im Cerebrum, noch im Cerebellum eine SPHK1a-IR der weißen oder grauen Substanz festgestellt werden. Im Gegensatz zum Aceton-fixierten Gewebe zeigte im Isopropanol-fixierten Cerebrum der Ratte in bestimmten Arealen der grauen Substanz eine Subpopulation der Neurone eine starke SPHK1a-IR. Die SPHK1a-immunreaktiven Neurone waren sowohl periventrikulär in Kernbereichen als auch oberflächlich in den Gyri cerebri zu finden, jedoch in allen Lokalisationen immer regional beschränkt. Die Beschränkung auf bestimmte Regionen und Neurone könnte mit der Verschaltung und Spezialisierung der Neurone zusammenhängen. Da nicht alle cerebralen Neurone SPHK1a-immunreaktiv waren, liegt die Annahme nahe, dass die SPHK1a bzw. S1P

nicht an essenziellen metabolischen oder funktionellen Regelmechanismen der Neurone, wie dies bei den glatten Muskelzellen vermutet wird, sondern nur bei spezifischen Prozessen einer bestimmten Subpopulation der Neurone beteiligt ist. Die fehlerfreie Funktion des Gehirns ist an das komplexe Zusammenwirken verschiedenster Regionen und Faserbahnen gebunden, die nicht selten weit verstreut im Gehirn lokalisiert sind. Es ist denkbar, dass die zu einem System gehörenden Neuronen über die gleichen Regelmechanismen verfügen bzw. über die gleichen Metabolite geregelt werden, wodurch sich die sehr unterschiedliche Verteilung der SPHK1a-immunreaktiven Neurone im Gehirn erklären würde.

Neben den immunreaktiven Neuronen zeigten unabhängig von der Fixierung die glatten Gefäßmuskelzellen eine starke SPHK1a-IR. Im Vergleich zu entsprechenden Gefäßen anderer Organe war die IR der cerebralen vaskulären Myozyten deutlich stärker, insbesondere bei den intracerebralen Gefäßen kleineren Durchmessers. Das Vorkommen der SPHK1a selbst in den muskelschwachen kleinen cerebralen Blutgefäßen könnte mit der Regulierung des Blutdrucks zusammenhängen, denn im Gehirn ist eine Ausdehnung des Gefäßbettes durch die knöcherne Begrenzung nur eingeschränkt möglich. Ein vermehrter Einstrom muss immer mit einem erhöhten Ausstrom gekoppelt sein, ansonsten resultiert ein Hirnödem. Auf Blutdruckschwankungen kann das Gehirn durch die Autoregulation des Blutdrucks schnell reagieren, denn bei Dysregulation resultiert schon nach Sekunden Schwindel und kurze Zeit später Bewusstlosigkeit und irreversible Schäden. Durch den hohen Gehalt an SPHK1a in den vaskulären Myozyten könnte eine genaue Blutdruckregulierung bis in die kleinen intracerebralen Gefäße möglich sein und so Blutdruckschwankungen vorbeugen. Der hohe Gehalt an SPHK1a in den glatten Muskelzellen erhöht die Ca^{2+} -Empfindlichkeit der kontraktilen Elemente, die dadurch in der Lage sind, auch auf kleine Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu reagieren (Bolz et al., 2003). Weiterhin könnte die SPHK1a via intrazelluläres S1P durch Beeinflussung der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern die myogene Reaktion der Myozyten steuern (Young et al., 2002; Bolz et al., 2003). Da S1P nicht nur als second messenger intrazellulär, sondern auch als Ligand extrazellulär agiert, könnte auch ein auto- bzw. parakriner Regelmechanismus denkbar sein, um auf die Kontraktilität der vaskulären Muskelzellen einzuwirken. Entsprechend wiesen verschiedene Untersuchungen bei den Hirngefäßen eine durch physiologische Konzentrationen von S1P induzierbare Vasokonstriktion nach (Tosaka et al., 2001; Coussin et al., 2002; Salomone et al., 2003).

Spinalganglien, N. ischiadicus

Bisherige Studien über das Vorkommen der SPHK im Nervensystem beschränken sich auf Untersuchungen des Gehirns, über das periphere Nervensystem und Rückenmark gibt es keine veröffentlichten Daten. In der vorliegenden immunhistochemischen Arbeit wurde die SPHK1a im Spinalganglion und im N. ischiadicus nur in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße nachgewiesen. Weder die Ganglienzellen, noch die Nervenfasern zeigten eine SPHK1a-IR. Die Neurone benötigen folglich für die Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus in den Perikara keine SPHK1a. Da weiterhin auch der Nachweis der SPHK1a in den Nervenfasern der Ganglien und des N. ischiadicus nicht erbracht werden konnte, scheint SPHK1a auch nicht an der Weiterleitung der Aktionspotenziale beteiligt zu sein, obwohl im Reizleitungssystem des Herzens schon gezeigt wurde, dass S1P in der Lage ist verschiedene Ionenkanäle zu beeinflussen. Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigen in isolierten Spinalganglien-Neuronen einen Anstieg der SPHK-IR (unpublizierte Daten).

Die SPHK1a-IR der vaskulären Muskelzellen veränderte sich in Abhängigkeit vom Gefäßgebiet und Gefäßdurchmesser: Bei den Myozyten der kleinen muskelschwachen Blutgefäße wurde keine SPHK1a-IR festgestellt. Insgesamt war die SPHK1a-IR der vaskulären Myozyten im Vergleich zu glatten Muskelzellen entsprechender Blutgefäße anderer Organe, wie Herz, M. biceps brachii, Darm, Niere oder auch Gehirn, geringer. Im peripheren Nervensystem hingegen, in perineuralen Blutgefäßen des N. ischiadicus war eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen vorhanden, die bei Eintritt der Gefäße in den Nerv abrupt endete. Der Nachweis der SPHK1a in den vaskulären Myozyten deutet auf eine Beteiligung des enzymatischen Produktes, S1P, an der Regulation des lokalen Blutflusses hin. Die genaue Wirkungsweise des S1P, intra- oder extrazellulär, auto- oder parakrin, ist jedoch auch hier noch nicht bekannt. Es bedarf daher noch weiterer Untersuchungen, um diese Regelmechanismen zu entschlüsseln.

Urogenitaltrakt

Niere

Verschiedene Studien wiesen sowohl das Produkt S1P (Van Veldhoven et al., 1994; Yatomi et al., 1997) als auch die synthetisierenden Enzyme, SPHK1 und SPHK2, (Kohama et al., 1998; Liu et al., 2000; Melendez et al., 2000) in Homogenaten der Niere unterschiedlicher Spezies nach. Eine spätere Enzymaktivitätsuntersuchung an Mäuse-Geweben bestätigte die hohe Konzentration der SPHK in der Niere (Fukuda et al., 2003). Auf Proteinebene wurde die SPHK1a in der Niere im Menschen immunhistochemisch nur in den Tubuli renales in hoher Konzentration nachgewiesen (Murate et al., 2001). Im Gegensatz dazu zeigte die immunhistochemische Untersuchung der vorliegenden Arbeit in der Ratten-Niere eine sehr starke SPHK1a-IR der glatten Muskulatur des Nierenbeckens und der Nierengefäße. Die kleinen Nierengefäße, wie die Aa. corticales radiatae, Vasa afferentes und efferentes, wiesen kein einheitliches Verteilungsmuster der SPHK1a-IR auf: Neben den SPHK1a-immunreaktiven Gefäßen konnten auch einige Gefäße identifiziert werden, die keine SPHK1a-immunreaktive Myozyten besaßen. Die differente SPHK1a-IR der Blutgefäße könnte mit der unterschiedlichen Durchblutung der Bereiche in der Niere zusammenhängen, so ist die Nierenrinde im Vergleich zum Nierenmark deutlich stärker durchblutet (Steinhausen et al., 1993) und könnte sich daher auch in der Regulierung des Blutflusses von der des Marks unterscheiden. Die Gefäße in der Nierenrinde zeigten zum größten Teil eine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen, wohingegen die Blutgefäße in der Medulla renalis keine SPHK1a-immunreaktiven vaskulären Myozyten besaßen, so zeigten die Vasa recta allgemein keine SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen. Die Vasa recta unterscheiden sich grundsätzlich auch durch ihren Wandbau, der perizytenreichen präkapillären Arterien entspricht, von den Blutgefäßen des Cortex renalis (Benninghoff und Drenckhahn, 2004b). Der unterschiedliche Wandaufbau und die SPHK1a-IR der glatten Gefäßmuskelzelle liefern somit Hinweise auf eine unterschiedliche Blutflussregulierung des Nierenmarks bzw. der Nierenrinde. Untersuchungen der renalen Blutdruckregulierung zeigten eine Reduktion des renalen Blutflusses durch die intravenöse Applikation von S1P (Bischoff et al., 2000), weiterhin konnte durch exogenes S1P eine Vasokonstriktion der Aa. interlobares ausgelöst werden (Bischoff et al., 2000). Die Reaktion der renalen Blutgefäße und der Nachweis der SPHK1a in

der vaskulären Muskulatur läßt auch in der Niere auf eine parakrine bzw. autokrine Wirkungsweise des S1P auf den regionalen Blutfluss schließen.

Uterus

Bislang gibt es noch keine Informationen über das Vorkommen der SPHK oder des S1P im Uterus. Die immunhistochemischen Ergebnisse dieser Arbeit sind daher die ersten veröffentlichten Daten über das Vorkommen der SPHK1a im Uterus der Ratte. Entsprechend den Resultaten der anderen untersuchten Organe zeigten auch hier die glatten Muskelzellen der Blutgefäße eine starke SPHK1a-IR. Bei den kleinen Gefäßen war die SPHK1a-IR deutlich geringer ausgeprägt als bei den Gefäßen größeren Durchmessers. Die Spiralarterien im Endometrium wiesen keine SPHK1a-IR auf. Weiterhin zeigten die glatten Myozyten des Myo- und Perimetriums eine sehr starke SPHK1a-IR. Die SPHK kann die myogene Reaktion und den Muskeltonus der Blutgefäße über S1P verändern (Bolz et al., 2003), daher wäre es auch denkbar, dass nicht nur die vaskuläre Myozyten, sondern auch die glatten Muskelzellen des Uterus durch die SPHK1a in ihrer Kontraktion beeinflusst werden, wie dies schon bei den glatten Muskelzellen der Atemwege (Rosenfeldt et al., 2003) und des Magens (Zhou et al., 2004) gezeigt wurde. Die SPHK1a-immunreaktiven Muskelzellen wären ferner über eine parakrine Wirkung des S1P durch die umgebenden Muskelzellen über S1P-Rezeptorenaktivierung beeinflussbar. Die parakrine Wirkung des S1P könnte zu einer Kontraktionssteigerung oder auch zu einer vermehrten Proliferation der glatten Muskelzellen (Auge et al., 1999) und der Fibroblasten (Olivera und Spiegel, 1993) führen, z. B. während der Schwangerschaft. Eine Untersuchung der Veränderung der Expression während der Schwangerschaft könnte eine wichtige Beteiligung der SPHK1a an den Umbauvorgängen des Uterus während der Schwangerschaft klären.

Im Uterus war die Lokalisation des Enzyms nicht nur auf vaskuläre Zellen oder die glatte Muskulatur beschränkt. Zwischen den Muskelfaserbündeln wies noch eine Subpopulation der interstitiellen Zellen eine sehr starke SPHK1a-IR auf, jedoch gelang eine weitere Zuordnung der Zellen nicht. Die durchgeführten Doppelimmunfluoreszenzen schlossen verschiedene immunkompetente Zellen aus, denn es konnte keine Komarkierung mit den Antikörpern ED1, ED2 oder OX6 nachgewiesen werden. Weitere Doppelimmunfluoreszenzen schlossen eine

Zugehörigkeit zu den kontraktilen Zelltypen des Uterus, wie glatte Muskelzellen und Myofibroblasten, aus, da die SPHK1a-immunreaktiven, interstitiellen Zellen keine α SMA-IR besaßen. Ferner enthielten die SPHK1a-immunreaktiven interstitiellen Zellen auch kein Vimentin, ein Marker für zervikale Fibroblasten. Die SPHK1a-immunreaktiven Zellen gehören somit weder zu den glatten Muskelzellen, den Myofibroblasten noch zu den zervikalen Fibroblasten.

Die nicht näher einzuordnenden SPHK1a-immunreaktiven Zellen könnten auf das umliegende Gewebe parakrin einwirken. So könnte der Wiederaufbau des Stratum functionale des Endometriums in der Proliferationsphase des Menstruationszyklus durch SPHK1a mit beeinflusst werden, da das enzymatische Produkt, S1P, extrazellulär neben einer proliferativen Wirkung auf Muskelzellen (Auge et al., 1999) und Fibroblasten (Olivera und Spiegel, 1993) auch die Angiogenese (English et al., 2002) im Endometrium steigern könnte. Untersuchungen der SPHK1a-Verteilung während der unterschiedlichen Phasen des Menstruationszyklus könnten hier wichtige Informationen zu der Beteiligung der SPHK1a liefern.

Nebenniere

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Untersuchungen über das Vorkommen der SPHK in der Nebenniere durchgeführt. Die SPHK1a wurde immunhistochemisch in der Nebenniere der Ratte nur in den glatten Muskelzellen der Gefäße nachgewiesen, das Parenchym zeigte keine SPHK1a-IR. Analog zu den anderen untersuchten Gefäßgebieten dieser Arbeit zeigten auch hier die vaskulären Myozyten mit abnehmenden Gefäßdurchmesser eine Verminderung der SPHK1a-IR. Die oberflächlichen Blutgefäße des Arteriennetzes wiesen eine starke SPHK1a-IR der glatten Muskelzellen auf, während die SPHK1a-IR der Aa. perforantes und der Zentralvene nur noch gering nachweisbar war. Bei den Kapillaren der Nebenniere konnte keine SPHK1a-IR festgestellt werden. Der Einfluss von SPHK1a bzw. des S1P auf den lokalen Blutfluss wird sicherlich auch hier eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation spielen. Jedoch unterscheidet sich das Gefäßsystem der Nebenniere von den meisten anderen Organen durch das Vorhandensein der weitgestellten medullären Kapillaren und besitzt somit auch differierende Regelmechanismen des Blutflusses in diesem Bereich. Die SPHK1a konnte

nur in den oberflächlichen Arteriennetzen nachgewiesen werden und somit wird auch die Beteiligung des S1P an der Blutdruckregulation an der Organoberfläche enden und erst wieder in den größeren SPHK1a-immunreaktiven Zentralvenen des Nebennierenmarks beginnen. Im Organinneren der Nebennieren wird das Blut vorwiegend in den fenestrierten Kapillaren transportiert und hier scheinen andere Mechanismen für die Regulierung der Blutversorgung ausschlaggebend zu sein. Der Zusammenhang der SPHK1a-Verteilung und die damit verbundene Blutdruckregulation ist jedoch noch nicht geklärt und es bedarf weiterer Forschung, um die exakten Regulierungsmechanismen zu verstehen, bisher konnte nur eine gefäßspezifische und konzentrationsabhängige Wirkung von S1P bzw. SPHK1a auf Blutgefäße gezeigt werden (Watterson et al., 2005).

Bewegungsapparat

M. biceps brachii

Schon 1997 konnte in der Skelettmuskulatur der Ratte S1P in geringer Konzentration nachgewiesen werden (Yatomi et al., 1997). Darauf folgende Northern Blot-Untersuchungen der humanen sowie auch der Mäuse-Skelettmuskulatur stellten eine geringe SPHK1-mRNA Konzentration fest (Kohama et al., 1998; Liu et al., 2000; Melendez et al., 2000). Weitere Northern-Blot-Studien an Skelettmuskulatur zeigten eine geringe SPHK2-Konzentration in humanen Gewebehomogenaten, im Mäuse-Skelettmuskel konnte jedoch keine SPHK2 nachgewiesen werden (Liu et al., 2000). Eine Enzymaktivitätsstudie stellte eine geringe Aktivität der SPHK im Mäuse-Skelettmuskel fest (Fukuda et al., 2003). In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen auf Proteinebene im Ratten-Skelettmuskel bestätigt werden: Nur vereinzelte Muskelfasern der Skelettmuskulatur wiesen eine geringe SPHK1a-IR auf, die übrigen zeigten keine IR. Bei den glatten Muskelzellen der Blutgefäße wiesen selbst die der kleinen muskelschwachen Gefäße eine sehr starke SPHK1a-IR auf. Im Vergleich zu entsprechenden Gefäßen anderer Organe, wie Trachea, Lunge, Leber und Uterus, war die SPHK1a-IR der vaskulären Myozyten im Skelettmuskel stärker. Die SPHK1a ist auch hier in der Skelettmuskulatur an der Regulation des lokalen Blutflusses beteiligt, wie Untersuchungen von Bolz et al. (2003) gezeigt haben: So führt eine Überexpression der

SPHK1a in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Verstärkung der myogenen Reaktion und des Muskeltonus der Widerstandsgefäße in der Skelettmuskulatur. Um den genauen Regelmechanismus der Blutflussregulierung durch SPHK1a bzw. S1P zu entschlüsseln, sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

Zwischen den Muskelfasern des *M. biceps brachii* waren vereinzelt Strukturen mit einer starken SPHK1a-IR zu erkennen, die nicht näher bestimmt werden konnten. Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen zeigten eine enge topographische Beziehung der mit einem Antikörper gegen NF68 markierten Nervenfasern und den SPHK1a-immunreaktiven Strukturen zwischen den einzelnen Muskelfaserbündeln, jedoch konnte keine Kolo­kalisierung der neuronalen und SPHK1a-immunreaktiven Strukturen nachgewiesen werden. Aufgrund der Lokalisation und Morphologie könnte es sich hierbei um Muskelspindeln des *M. biceps brachii* handeln, die SPHK1a-immunreaktive kontraktile Kernketten oder Kernhaufenfasern beinhalten. Die SPHK1a in den Kernketten- oder Kernhaufenfasern könnte über Erhöhung der Ca^{2+} -Sensibilität der kontraktile Elemente via S1P (Young et al., 2002) die Empfindlichkeit der Muskelspindeln auf Dehnungsreize steuern (Kahle et al., 1991) und dadurch auch geringe Änderungen der Muskelkontraktion bzw. -länge registrieren und weiterleiten. Weiterhin kann SPHK1a auch über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder durch Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle eine stärkere Zellantwort bewirken und somit auch sehr kleine Änderungen der Muskellänge- oder -kontraktion weiterleiten (Young et al., 2002; Alewijnse et al., 2004). Die Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Ca^{2+} -Sensitivität durch SPHK1a wurden nur in glatten Muskelzellen (Alewijnse et al., 2004; Watterson et al., 2005) untersucht, der SPKH1a-Wirkungsnachweis in den intrafusalen Fasern der Muskelspindeln fehlt bislang noch.

Die hier vorgestellten Daten zeigen eine weitreichende organspezifische Verteilung der SPHK1 und bilden die Grundlage zum Verständnis der Funktion bioaktiver Sphingolipide in der Homöostase verschiedener Organe. Die Kenntnis der Lokalisation ist eine unbedingte Voraussetzung für die Adressierbarkeit durch pharmakologische Intervention. Die konsistente Präsenz des Enzyms in den Bereichen der Gefäße unterstützt die funktionellen Untersuchungen und stellt das Sphingosinkinase/Sphingosin 1-Phosphatsystem als einen wichtigen Faktor in der Regulation der Organdurchblutung dar.

Zusammenfassung

Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ein bioaktives Sphingophospholipid, ist an vielen wichtigen zellulären Regelmechanismen, wie z.B. der Apoptose, Proliferation, Kontraktion und Inflammation beteiligt. S1P wirkt intrazellulär als second messenger, aber auch extrazellulär als Ligand einer Gruppe von fünf G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren. S1P wird durch Sphingosinkinasen (SPHK) aus Sphingosin generiert. Die identifizierten beiden SPHK-Isoformen, SPHK1 und 2, weisen neben spezifischen Eigenschaften auch verschiedene Lokalisationen in der Zelle auf. Man unterscheidet 2 funktionell identische SPHK1 Isoformen: SPHK1a und SPHK1b. Die SPHK1, wichtig für Wachstum und Überleben der Zelle, ist durch verschiedenste Moleküle, wie Liganden von Wachstumsfaktorrezeptoren (PDGF, EGF, VEGF), von G-Protein-gekoppelten (Acetylcholin) und von Immunoglobulin-Rezeptoren (FcγRI, FcγRIII) sowie auch durch Zytokine (TNFα) aktivierbar.

Obgleich S1P in die Regulation wichtiger essenzieller Signaltransduktionswege integriert ist, bestehen nur unzureichende Informationen über die Lokalisation des S1P-generierenden Enzyms SPHK1 in den verschiedenen Organsystemen. In dieser Arbeit wurde immunhistochemisch die Lokalisation des SPHK1a-Proteins in verschiedenen Organsystemen der Ratte untersucht. Nahezu alle arteriellen Stromgebiete des Körperkreislaufs zeigten von den organversorgenden Hauptästen bis hin zu den kleinen Arteriolen und Venolen in der glatten Muskulatur eine SPHK1a-Immunreaktivität (IR); Arterien muskulären Bautyps hierbei stärker als Arterien des elastischen Typs und Venen. Weiterhin war die Intensität der Immunreaktivität der glatten Gefäßmuskulatur abhängig von der Gefäßgröße. Die SPHK1a-IR war auch in Abhängigkeit vom Organ unterschiedlich ausgeprägt. So wiesen die Arterien des Gehirns, Herzens, Zunge, der verschiedenen Darmanteile, Niere und des M. biceps brachii eine stärkere Immunfluoreszenz der glatten Muskulatur auf als vergleichbare Gefäße der Trachea, Lunge, Leber, Nebenniere, Uterus und Vasa nervorum großer Nerven. Die ubiquitäre Lokalisation der SPHK1a in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße erweitert die Ergebnisse der Untersuchungen an Blutgefäßen, die eine Beteiligung der S1P an vaskulären Regelmechanismen nachwiesen.

Die nicht-vaskuläre glatte Muskulatur der untersuchten inneren Organe, wie Atemwege, Gastrointestinaltrakt, Nierenbecken und Uterus, zeigte eine deutlich stärkere SPHK1a-Immunreaktivität als die glatte Muskulatur der Blutgefäße. Nicht-glattmuskuläre neuronale Zellen mit einer SPHK1a-IR wurden im Großhirn in bestimmten Bereichen um die Ventrikel und in verschiedenen Arealen des Cortex nachgewiesen. Das Vorkommen der SPHK1a in

bestimmten Neuronenpopulationen weist auf eine Beteiligung von S1P in der Funktion von Neuronen hin. Die im Uterus beobachteten SPHK1a-IR Zellen zeigten weder eine Kolo-kalisation mit Markern immunkompetenter Zellen, noch mit glattmuskulärem Aktin. Weiterhin wurden vereinzelte nicht-glattmuskuläre, SPHK1a-immunreaktive Zellen in den Glandulae intestinales und tracheales nachgewiesen. In Zellen mit einer hohen Proliferations- und Mitoserate, wie im Uterus, in den Glandulae intestinales und tracheales, wurde eine hohe Konzentration intrazellulärer SPHK1a detektiert, was für eine para/autokrine S1P-vermittelte Stimulation der Mitoserate spricht.

Die Integration des SPHK1a/S1P Signalwegs in essenzielle Signaltransduktionswege ist bekannt, jedoch konnten bisher weder die Quellen des S1P, d.h. die synthetisierenden Zellen, noch die genauen Regulationsmechanismen entschlüsselt werden. Lediglich der Zusammenhang zwischen der Dysregulation verschiedener Sphingolipid-Regelmechanismen und der Pathogenese einiger Erkrankung wie Arteriosklerose, arterieller Hypertonie, Apoplex, Asthma bronchiale und Autoimmunerkrankungen konnte bisher festgestellt werden. Die vorliegende Arbeit bildet einen Baustein für weiterführende Untersuchungen der extra- und intrazellulären Wirkung von S1P und der Entschlüsselung der zu Grunde liegenden Sphingolipid-Regelmechanismen.

Summary

The bioactive sphingolipid sphingosine 1-phosphate (S1P) is an important modulator of cellular processes like apoptosis, proliferation, contraction and inflammation. S1P acts intracellularly as a second messenger and interact upon release extracellularly with a class of five different G-protein coupled S1P-receptors. S1P is synthesized via two sphingosine kinase isoforms (SPHK1 and 2). The SPHK1 and 2 have different properties and intracellular localisations. Two functional identical SPHK1 isoforms, SPHK1a and b, can be discriminated. The SPHK1 enzyme is important for growth and viability of cells and can be activated by a huge variety of different molecules like ligands of growth factor receptors (PDGF, EDG, VEGF), G-protein coupled receptors (acetylcholine), immunoglobulin receptors (FcγRI, FcγRIII) and cytokine receptors (TNF).

The importance of SPHK1/S1P as part of essential signalling pathways is clear but the cell specific localisation of the enzyme remained to be determined. In this study we investigated by means of immunohistochemistry the localization of the SPHK1a-protein in different

organs of the rat. SPHK1a-immunoreactivity (IR) was found in the vascular smooth muscle of almost all main arteries, from the aorta down to the level of the arterioles. Arteries from the muscular type showed stronger IR compared to elastic arteries and veins. The intensity of the IR was also dependent on the vessel size with stronger IR in larger vessels. The SPHK1a-IR showed an organ specific pattern. The immunoreactivity of arterial smooth muscle was stronger in brain, heart, tongue, gastrointestinal tract and striated muscle compared to airways, liver, adrenal, uterus and the vasa nervorum. The almost ubiquitous localisation in vascular smooth muscle corroborates the physiological and biochemical results and indicates an important role of SPHK1/S1P in the regulation of vascular function. The SPHK1a-IR of non-vascular smooth muscle of inner organs like airways, gastrointestinal tract, renal pelvis and uterus was stronger compared to the vascular smooth muscle. Non-muscular cells in the grey matter of the forebrain and around the ventricles of the brain also exhibited SPHK1a-IR which points to an involvement of S1P signalling in neuronal function. SPHK1a-IR was also present in cells of the uterus that could not be stained with markers for immune cells or smooth muscle. In addition, single non-muscular cells that were SPHK1-IR could also be found in intestinal and tracheal glands which were known to contain cells with a high proliferative capacity.

It is well known that the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate pathway is coupled to essential signalling transduction pathways and a dysbalance of the spingolipid system is coupled to diseases like arteriosclerosis, hypertonie, apoplexy, asthma and autoimmune diseases prior to the work of this thesis however the S1P synthesizing cells were unknown in most organs. Therefore, this work is of relevance for subsequent investigations of intra- and extracellular actions of S1P.

Literaturverzeichnis

- Adachi-Yamada T., Gotoh T., Sugimura I., Tateno M., Nishida Y., Onuki T., Date H. (1999). De novo synthesis of sphingolipids is required for cell survival by down-regulating c-Jun N-terminal kinase in *Drosophila* imaginal discs. *Mol Cell Biol*, 19: 7276-7286.
- Allende M. L., Proia R. L. (2002). Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim Biophys Acta*, 1582: 222-227.
- Ammit A. J., Hastic A. T., Edsall L. C., Hoffman R. K., Amrani Y., Krymskaya V. P., Kanc S. A., Peters S. P., Penn R. B., Spiegel S., Panettieri R. A. Jr (2001). Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma. *FASEB J*, 15: 1212-1214.
- Ancellin N., Colmont C., Su J., Li Q., Mittereder N., Chae S-S., Stefansson S., Liao G., Hla T. (2002). Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J Biol Chem*, 277: 6667-6675.
- Anliker B., Chun J. (2004). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 279: 20555-20558.
- Archer S. (1996). Diversity of phenotype and function of vascular smooth muscle cells. *J Lab Clin Med* 127: 524-529.
- Augé N., Nikolova-Karakashian M., Carpentier S., Parthasarathy S., Nègre-Salvayre R., Merrill A. H. Jr., Levade T. (1999). Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. *J Biol Chem*, 274: 21533-21538.
- Banno Y., Kato M., Hara A., Nozawa Y. (1998). Evidence for the presence of multiple forms of Sphingosine kinase in human platelets. *Biochem J*, 335: 301-304.
- Baumruker T., Bornancin F., Billich A. (2005). The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses. *Immunol Lett*; 96(2):175-185.
- Benediktsdottir V. E., Jonsdottir A. M., Skuladottir B. H., Grunberg A., Skarphedinsson J. O., Helgason J., Gudbjarnason S. (2002). Sphingosine modulation of cAMP levels and beating rate in rat heart. *Fundam Clin Pharmacol*, 16: 495-502.

-
- Benninghoff A., Drenckhahn D. (2004). Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1; 16. Auflage. Urban und Fischer-Verlag. ISBN 3-437-42340-1.
- Benninghoff A., Drenckhahn D. (2004). Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 2; 16. Auflage. Urban und Fischer-Verlag. ISBN 3-437-42350-9.
- Berger I., Weckauf H., Helmchen, Ehemann V., Penzel R., Fink B., Bernd L., Autschbach F. (2005). Rheumatoid arthritis and pigmented villonodular synovitis: comparative analysis of cell polyploidy, cell cycle phases and expression of macrophage and fibroblast markers in proliferating synovial cells. *Histopathology*, 46 (5): 490-497.
- Berse B., Brown L. F., Van De Water L., Dvorak H. F., Senger D. R. (1992). Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*, 3: 211-220.
- Birchwood C. J., Saba J. D., Dickson R. C., Cunningham K. W. (2001). Calcium influx and signalling in yeast stimulated by intracellular sphingosine 1-phosphate accumulation. *J Biol Chem*, 276: 11712-11718.
- Bischoff A., Czyborra P., Fetscher C., Meyer zu Heringdorf D., Jakobs K. H., Michel M. C. (2000). Sphingosine-1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine constrict renal and mesenteric microvessels in vitro. *Br J Pharmacol*, 130: 1871-1877.
- Bischoff A., Czyborra P., Meyer zu Heringdorf D., Jakobs K. H., Michel M. C. (2000). Sphingosine-1-phosphate reduces rat renal and mesenteric blood flow in vivo in a pertussis toxin-sensitive manner. *Br J Pharmacol*, 130: 1878-1883.
- Bolz S-S., Vogel L., Sollinger D., Derwand R., Boer C., Pitson S. M., Spiegel S., Pohl U. (2003). Sphingosine kinase modulates microvascular tone and myogenic responses through activation of RhoA/Rho kinase. *Circulation*, 108: 342-347.
- Bucher O., Wartenberg H. (1997). Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Verlag Hans Huber, ISBN 3-456-82785-7.
- Campbell G. R., Campbell J. H. (2000). Vascular smooth muscle and arterial calcification. *Z Kardiol* 89, Suppl 2: II/54-II/62.
- Campbell G. R., Campbell J. H., Manderson J. A., Horrigan S., Rennick R. E. (1988). Arterial smooth muscle – A multifunctional mesenchymal cell. *Arch Pathol Lab Med* 112: 977-986.

-
- Cavallini A. L., Ligutti J. A., Gellings N. M., Castro E., Page M. T., Klepper R. E., Palade P. T., McNutt W. T., Sabbadini R. A. (2002). The role of TNF α and sphingolipid signaling in cardiac hypoxia: evidence that cardiomyocytes release TNF α and sphingosine. *Basic Appl Myol*, 12: 167-175.
- Cavallini L., Venerando R., Miotto G., Alexandre A. (1999). Ganglioside GM1 protection from apoptosis of rat heart fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*, 370: 156-162.
- Choi O. H., Kim J-H., Kinet J-P. (1996). Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the Fc ϵ RI antigen receptor. *Nature*, 380: 634-636.
- Chun J., Goetzl E. J., Hla T., Igarashi Y., Lynch K. R., Moolenaar W., Pyne S., Tigyi G. (2002). International union of pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, 54: 265-269.
- Cinque B., Di Marzio L., Centi C., Di Rocco C., Riccardi C., Cifone M. G. (2003). Sphingolipids and the immune system. *Pharmacol Res*, 47: 421-437.
- Coussin F., Scott R. H., Wise A., Nixon G. F. (2002). Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signalling pathways in vascular smooth muscles: differential role in vasoconstriction. *Circ Res*, 91: 151-157.
- Cuvillier O., Pirianov G., Kleuser B., Vanek P. G., Coso O. A., Gutkind S., Spiegel S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381: 800-803.
- Dantas A. P. V., Igarashi J., Michel T. (2003). Sphingosine 1-phosphate and control of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284: H2045-H2052.
- Dijkstra C. D., Dopp E. A., Joling P., Kraal G. (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*, 54(3): 589-599.
- Ediger T. L., Toews M. L. (2000). Synergistic stimulation of airway smooth muscle cell mitogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*, 294: 1076-1082.
- Edsall L. C., Cuvillier O., Twitty S., Spiegel S., Milstien S. (2001). Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *J Neurochem*, 76: 1573-1584.
- English D., Brindley D. N., Spiegel S., Garcia J. G. N. (2002). Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate. *Biochim Biophys Acta*, 1582: 228-239.

-
- Erlinge D (2004). Extrazellulär ATP: a central player in the regulation of vascular smooth muscle phenotype. Focus on "Dual role of PKA in phenotype modulation of vascular smooth muscle cells by extracellular ATP". *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C260-C262.
- Erlinge D. (1998). Extracellular ATP: A growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmac*, (31), 1: 1-8.
- Fairfax A., Doniach D. (1976). Autoantibodies to cardiac conducting tissue and their characterization by immunofluorescence. *Clin Exp Immunol*, 23 (1): 1-8.
- Fähling M., Perlewitz A., Doller A., Thiele B-J. (2004). Regulation of collagen prolyl 4-hydroxylase and matrix metalloproteinases in fibrosarcoma cells by hypoxia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 139 (1-3): 119-126.
- Forrest M., Sun S. Y., Hajdu R., Bergstrom J., Card D., Doherty G., Hale J., Keohane C., Meyers C., Milligan J., Mills S., Nomura N., Rosen H., Rosenbach M., Shei G., Singer I. I., Tian M., West S., White V., Xie J., Proia R., Mandala S. (2004). Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor sub-types. *J Pharmacol Exp Ther*, 309: 758-768.
- Franco D., Icardo J. M. (2001). Molecular characterization of the ventricular conduction system in the developing mouse heart: topographical correlation in normal and congenitally malformed hearts. *Cardiovasc Res*, 49 (2): 417-429.
- Frid M. G., Dempsey E. C., Durmowicz A. G., Stenmark K. R. (1997). Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. *Arterioscler Thrombo and Vasc Biol*, 17: 1203-1209.
- Frid M. G., Moiseeva E. P., Stenmark K. R. (1994). Multiple phenotypically distinct smooth cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. *Circ Res*, 75: 733-741.
- Friedrichs G. S., Swillo R. E., Jow B., Bridal T., Numann R., Warner L. M., Killar L. M., Sidek K. (2002). Sphingosine modulates myocyte electrophysiology, induces negative inotropy, and decreases survival after myocardial ischaemia. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39: 18-21.
- Fujino M., Funeshima N., Kitazawa Y., Kimura H., Amemiya H., Suzuki S., Li X. K. (2003). Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis by FTY720 treatment. *J Pharmacol Exp Ther*, 305: 70-77.

-
- Fukuda Y., Kihara A., Igarashi Y. (2003). Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1. *Biochem Biophys Res Commun*, 309: 155-160.
- Futerman A. H., Hannun Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*, 5: 777-782.
- Garcia J. G., Liu F., Verin A. D., Birukova A., Dechert M. A., Gerthoffer W. T., Bamberg J. R., English D. (2001). Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest*, 278: 47281-47290.
- Gijsbers S., Van der Hoeven G., Van Veldhoven P. P. (2001). Subcellular study of sphingoid base phosphorylation in rat tissues: evidence for multiple sphingosine kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1532: 37-50.
- Gjomarkaj M., Pace E., Melis M., Spatafora M., Profita M., Vignola A. M., Bonsignore G., Toews G. B. (1999). Phenotypic and functional characterization of normal rat pleural macrophages in comparison with autologous peritoneal and alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol*, 20: 135-142.
- Gittenberger-de Groot A. C., DeRuiter M. C., Bergwerff M., Poelmann R. E. (1998). Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 1589-1594.
- Goetzl E. J., An S. (1998). Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J*, 12:1589-1598.
- Gosh T. K., Bian J., Gill D. L. (1990). Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science*, 248: 1653-1656.
- Gosh T. K., Bian J., Gill D. L. (1994). Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J Biol Chem*, 269: 22628-22635.
- Graler M. H., Bernhardt G., Lipp M. (1998). Edg6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics*, 53: 164-169.
- Hannun Y. A., Luberto C., Argraves K. M. (2001). Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry*, 40: 4893-4903.

-
- Hao H., Gabbiani G., Bochaton-Piallat M-L. (2003). Arterial smooth muscle cell heterogeneity – Implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 1510-1520.
- Hillebrands J-L., Klatter F. A., Rozing J. (2003). Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 380-387.
- Himmel H. M., Meyer zu Heringsdorf D., Graf E., Dobrev D., Kortner A., Schuler S., Jakobs K. H., Ravens U. (2000). Evidence for Edg-3 receptor-mediated activation of I(K.ACh) by sphingosine-1-phosphate in human atrial cardiomyocytes. *Mol Pharmacol* 58: 449-454.
- Hla T. (2003). Signalling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol Res*, 47: 401-407.
- Hla T., Lee M. J., Ancellin N., Paik J. H., Kluk M. J. (2001). Lysophospholipids: receptor revelations. *Science*, 294: 1875-1878.
- Hla T., Maciag T. (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 265: 9308-9313.
- Hughes A. D., Clunn G. F., Refson J., Demoliou-Mason C. (1996). Platelet-derived growth factor (PDGF): Actions and mechanism in vascular smooth muscle. *Gen Pharmac* (27), 7: 1079-1089.
- Igarashi N., Okada T., Hayashi S., Fujita T., Jahangeer S., Nakamura S. I. (2003). Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J Biol Chem*, 278: 46832-46839.
- Igarashi Y., Yatomi Y. (1998). Sphingosine-1-phosphate is a blood constituent released from activated platelets, possibly playing a variety of physiological and pathophysiological roles. *Acta Biochim Pol*, 45: 299-309.
- Im D.-S., Heise C., E., Ancellin N., O'Dowd B. F., Shei G., Heavens R. P., Rigby M. R., Hla T., Mandala S., McAllister G., George S. R., Lynch K. R. (2000). Characterization of a Novel Sphingosine 1-Phosphate Receptor, Edg-8. *J Biol Chem*, 275: 14281-14286.
- Ishii I., Friedman B., Ye X., Kawamura S., McGiffert C., Contos J. J., Kingsbury M. A., Zhang G., Brown J. H., Chun J. (2001). Selective loss of sphingosine 1-phosphate signalling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/Edg-3. *J Biol Chem*, 276: 33697-33704.

-
- Itagaki K., Hauser C. J. (2003). Sphingosine-1-phosphate: a diffusible calcium influx factor mediating store-operated calcium entry. *J Biol Chem*, 278: 168-173.
- Jenkins G. M., Hannun Y. A. (2001). Role for de novo sphingoid base biosynthesis in the heart-induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 276: 8574-8581.
- Jin Z-Q., Goetzl E. J., Karliner J. S. (2004). Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation*, 110: 1980-1989.
- Jin Z-Q., Zhou H-Z., Zhu P., Mochly-Rosen D., Messing R. O., Goetzl E. J., Karliner J. S., Gray M. O. (2001). Cardioprotection mediated by sphingosine 1-phosphate in epsilon PKC knockout mice. *Circulation*, 104 (Suppl. II): II-209.
- Jin Z-Q., Zhou H-Z., Zhu P., Honbo N., Mochly-Rosen D., Messing R. O., Goetzl E. J., Karliner J. S., Gray M. O. (2002). Cardioprotection mediated by sphingosine-1-phosphate and Ganglioside GM-1 in wild-type and PKC ϵ knockout mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282: H1970-H1977.
- Johns D. G., Dorrance A. M., Leite R., Weber D. S., Webb R. C. (2000). Novel signaling pathways contributing to vascular changes in hypertension. *J Biomed Sci*, 7: 431-443.
- Johns D. G., Webb R. C., Charpie J. R. (2001). Impaired ceramide signalling in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle: a possible mechanism for augmented cell proliferation. *J Hypertens*, 19: 63-70.
- Johnson K. R., Becker K. P., Facchinetti M. M., Hannun Y. A., Obeid L. M. (2002). PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 277:35257-35262.
- Jolly P. S., Rosenfeldt H. M., Milstien S., Spiegel S. (2001). The roles of sphingosine-1-phosphate in asthma. *Mol Immunol*, 38: 1239-1245.
- Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O. (2002). *Lehrbuch der Histologie*. Springer-Verlag, ISBN 3-540-41858-X.
- Junqueira L., C., Carneiro J. (1996). *Histologie - Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Springer-Verlag, 3-540-60404-9.
- Kahle W., Leonhardt H., Platzer W. (1991). *Nervensystem und Sinnesorgane, Band 3*. Thieme-Verlag, ISBN 3-13-492206-1.
- Karliner J. S. (2002). Lysophospholipids and the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta*, 1582: 216-221.

-
- Karliner J. S., Honbo N., Summers K., Gray M. O., Goetzel E. J. (2001). The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 32: 1779-1986.
- Kester M., Kolesnick R. (2003). Sphingolipids as therapeutics. *Pharmacol Res*, 47: 365-371.
- Kohama T., Olivera A., Edsall L., Nagiec M. M., Dickson R., Spiegel S. (1998). Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem*, 273 (37): 23722-23728.
- Kolesnick R. N., Krönke M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 643-665.
- Kupperman E., An S., Osborne N., Waldron S, Stainier D. Y. (2000). A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature*, 406: 192-195.
- Larmonier N., Ghiringhelli F., Larmonier C. B., Moutet M., Fromentin A., Baulot E., Solary E., Bonnotte B., Martin F. (2003). Freshly isolated bone marrow cells induce death of various carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 107: 747-756.
- Le Stunff H., Galve-Roperh I., Peterson C., Milstien S., Spiegel S. (2002a). Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J Cell Biol*, 158: 1039-1049.
- Le Stunff H., Mikami A., Giussani P., Hobson J. P., Jolly P. S., Milstien S., Spiegel S. (2004a). Role of Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in epidermal growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem*, 279 (33): 34290-34297.
- Le Stunff H., Milstien S., Spiegel S. (2004b). Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *J Cell Biochem*, 92: 882-899.
- Le Stunff H., Peterson C., Thornton R., Milstien S., Mandala S. M., Spiegel S. (2002b). Characterization of murine sphingosine-1-phosphate phosphate phosphohydrolase. *J Biol Chem*, 277: 8920-8927.
- Lecour S., Smith R. M., Woodward B., Opie L. H., Rochette L., Sack M. N. (2002). Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF- α and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, 34:509–518.
- Lee M. J., Thangada S., Claffey K. P., Ancellin N., Liu C. H., Kluk M., Volpi M., Sha'afi R. I., Hla T. (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*, 99: 301-312.

-
- Lee M. J., Van Brocklyn J. R., Thangada S., Liu C. H., Hand A. R., Menzeleev R., Spiegel S, Hla T. (1998). Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*, 279: 1552-1555.
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. (1998): *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 3-8274-0325-1.
- Lenzi G. L., Grigoletto F., Gent M., Roberts R. S., Walker M. D., Easton J. D., Carolei A., Dorsey F. C., Rocca W. A., Bruno R., Patarnello F., Fieschi C. (1994). Early Stroke Trial Group: Early treatment of stroke with monosialoganglioside GM-1. Efficacy and safety results of the early stroke trial. *Stroke*, 25: 1552-1558.
- Lincoln T. M., Dey N., Sellak H. (2001). Signal transduction in smooth muscle – cGMP-dependent protein signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol*, 91: 1421-1430.
- Liu H., Charavarty D., Maceyka M., Milstien S., Spiegel S. (2002). Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 71: 493-511.
- Liu H., Sugiura M., Nava V. E., Edsall L. C., Kono K., Poulton S., Milstien S., Kohama T., Spiegel S. (2000). Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem*, 275 (26): 19513-19520.
- Liu H., Toman R. E., Goparaju S. K., Maceyka M., Nava V. E., Sankala H., Payne S. G., Bektas M., Ishii I., Chun J., Milstien S., Spiegel S. (2003a). Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J Biol Chem*, 278: 40330-40336.
- Liu S. J., Kennedy R. H. (2003b). Positive inotropic effect of ceramide in adult ventricular myocytes: mechanism dissociated from its reduction in Ca^{2+} influx. *Am J Physiol*, 285: H735-H744.
- Liu Y., Wada R., Yamashita T., Mi Y., Deng C. X., Hobson J. P., Rosenfeldt H. M., Nava V. E., Chae S. S., Lee M. J., Liu C. H., Hla T., Spiegel S., Proia R. L. (2000). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*, 106: 951-961.
- MacLennan A. J., Marks L., Gaskin A. A., Lee N. (1997). Embryonic expression pattern of H218, a G-protein coupled receptor homolog, suggests roles in early mammalian nervous system development. *Neuroscience*, 79: 217-224.
- Mandala S., Hajdu R., Bergstrom J., Quackenbush E., Xie J., Milligan J., Thornton R., Shei G-J., Card D., Keohane C., Rosenbach M., Hale J., Lynch C. L., Rupprecht K.,

- Parsons W., Rosen H. (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine 1-phosphate receptor agonists. *Science*, 296: 346-349.
- Mandala S., Thornton R., Galve-Roperh I., Poulton S., Peterson C., Olivera A., Bergstrom J., Kurtz M. B., Spiegel S. (2000). Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 7859-7864.
- Mathes C., Fleig A., Penner R. (1998). Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine. *J Biol Chem*, 273: 25020-25030.
- Mathias S., Pena L. A., Kolesnick R. N. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J*, 335: 465-480.
- Mattie M., Brooker G., Spiegel S. (1994). Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol triphosphate-independent pathway. *J Biol Chem*, 269: 3181-3188.
- Mazurais D., Robert P., Gout B., Berrebi-Bertrand I., Laville M. P., Calmels T. (2002). Cell type-specific localization of human cardiac S1P receptors. *J Histochem Cytochem*, 50: 661-670.
- McGiffert C., Contos J. J., Friedman B., Chun J. (2002). Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for slp_1 in neurogenesis and slp_{1-3} in angiogenesis. *FEBS Lett*, 531: 103-108.
- Meacci E., Cencetti F., Formigli L., Squecco R., Donati C., Tiribilli B., Quercioli F., Zecchi Orlandini S., Arancini F., Bruni P. (2002). Sphingosine 1-phosphate evokes calcium signals in C2C12 myoblasts via Edg3 and Edg5 receptors. *Biochem J*, 362: 349-357.
- Melendez A. J., Khaw A. K. (2002). Dichotomy of Ca^{2+} signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. *J Biol Chem*, 277: 17255-17262.
- Merrill A. H. Jr (2002). De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem*, 277: 25843-25846.
- Meyer zu Heringdorf D., Lass H., Alemany R., Laser K. T., Neumann E., Zhang C., Schmidt M., Rauen U., Jakobs K. H., van Koppen C. J. (1998). Sphingosine kinase-mediated Ca^{2+} signalling by G-protein-coupled receptors. *EMBO J*, 17: 2830-2837.
- Meyer zu Heringdorf D., Lass H., Kuchar I., Alemany R., Guo Y., Schmidt M., Jakobs K. H. (1999). Role of sphingosine kinase in Ca^{2+} signalling by epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett*, 461: 217-222.

-
- Meyer zu Heringdorf D., Lass H., Kuchar I., Lipinski M., Alemany R., Rümenapp U., Jakobs K. H. (2001). Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *Eur J Pharmacol*, 414: 145-154.
- Michel C., Van Echten-Deckert G. (1997). Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmatic reticulum. *FEBS Lett*, 416: 153-155.
- Morales-Ruiz M., Lee M. J., Zollner S., Gratton J. P., Scotland R., Shiojima I., Walsh K., Hla T., Sessa W. C. (2001). Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a G_i protein/phospho-inositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem*, 276: 19672-19677.
- Murate T., Banno Y., T-Koizumi K., Watanabe K., Mori N., Wada A., Igarashi Y., Takagi A., Kojima T., Asano H., Akao Y., Yoshida S., Saito H., Nozawa Y. (2001). Cell type-specific localization of sphingosine kinase 1a in human tissues. *J Histochem Cytochem*, 49: 845-855.
- Nagiec M. M., Skrzypek M., Nagiec E. E., Lester R. L., Dickson R. C. (1998). The LCB4 (YOR171c) and LCB5 (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode long chain base kinases. *J Biol Chem*, 273: 19437-19442.
- Nakajima N., Cavalli A. L., Biral D., Glembotski C. C., McDonough P. M., Ho P. D., Betto R., Sandona D., Palade P. T., Dettbarn C. A., Klepper R. E., Sabbadini R. A. (2000). Expression and characterization of Edg-1 receptors in rat cardiomyocytes: calcium deregulation in response to sphingosine 1-phosphate. *Eur J Biochem*, 267: 5679-5686.
- Nehls V., Drenckhahn D. (1991). Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol*, 113: 147-154.
- Nofer J. R., van der Giet M., Tolle M., Wolinska I., von Wnuck Lipinski K., Baba H. A., Tietge U. J., Godecke A., Ishii I., Kleuser B., Schafers M., Fobker M., Zidek W., Assmann G., Chun J., Levkau B. (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P₃. *J Clin Invest*, 113: 569-581.
- Ogretmen B., Hannun Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature*, 4: 604-616.
- Ohmori T., Yatomi Y., Osada M., Kazama F., Takafuta T., Ikeda H., Ozaki Y. (2003). Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P₂. *Cardiovasc Res*, 58: 170-177.

-
- Okamoto H., Takuwa N., Gonda K., Okazaki H., Chang K., Yatomi Y., Shigematsu H., Takuwa Y. (1998). EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a $G_{i/o}$ to multiple signalling pathways, including phospholipase C activation, Ca^{2+} mobilization, adenylate cyclase inhibition. *J Biol Chem*, 273 (42): 27104-27110.
- Olivera A., Kohama T., Edsall L., Nava V., Cuvillier O., Poulton S., Spiegel S. (1999). Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol*, 147: 545-558.
- Olivera A., Kohama T., Tu Z., Milstien S., Spiegel S. (1998). Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J Biol Chem*, 273(20); 12576-12583.
- Olivera A., Spiegel S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as a second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365: 557-560.
- Olivera A., Spiegel S. (2001). Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins other Lipid Mediat*, 64: 123-134.
- Owens G. K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 75: 487-517.
- Panetti T. S. (2002). Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatic acid on endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1582: 190-196.
- Payne S. G., Milstien S., Spiegel S. (2002). Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett*, 531: 54-57.
- Pettus B. J., Bielawski J., Porcelli A. M., Reames D. L., Johnson K. R., Morrow J., Chalfant C. E., Obeid L. M., Hannun Y. A. (2003). The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF- α . *FASEB J*, 17: 1411-1421.
- Pettus B. J., Chalfant C. E., Hannun Y. A. (2002). Ceramide in apoptosis: An overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1585: 114-125.
- Pfaff M., Powaga N., Akinci S., Schütz W., Banno Y., Wiegand S., Kummer W., Wess J., Haberberger R. V. (2005). Activation of the SPHK/S1P signalling pathway is coupled to muscarinic receptor-dependent regulation of peripheral airways. *Respiratory Research*, 6: 48-61.
- Pitson S. M., Moretti P. A., Zebol J. R., Zareie R., Derian C. K., Darrow A. L., Qi J., D'Andrea R. J., Bagley C. J., Vadas M. A., Wattenberg B. W. (2002). The

- nucleotide-binding site of human sphingosine kinase. *J Biol Chem*, 275: 33945-33950.
- Prieschl E. E., Csongra R., Novotny V., Kikuchi G. E., Baumruker T. (1999). The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after Fc ϵ RI triggering. *J Exp Med*, 190: 1-8.
- Pyne S., Chapman J., Steele L., Pyne N. J. (1996). Sphingomyelin-derived lipids differentially regulate the extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal cascades in airway smooth muscle. *Eur J Biochem*, 237: 819-826.
- Pyne S., Pyne N. J. (2000). Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J*, 349: 385-402.
- Radeff-Huang J., Seasholtz T. M., Matteo R. G., Brown J. H. (2004). G protein mediated signalling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J Cell Biochem*, 92: 949-966.
- Radin N. S. (2003). Killing tumours by Ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *Biochem J*, 371: 243-256.
- Relling D. P., Hintz K. K., Ren J. (2003). Acute exposure of ceramide enhances cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*, 140: 1163-1168.
- Ren J., Dong L., Xu C-B., Pan B-R. (2002). Expression of sphingosine kinase gene in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol*, 8 (4): 602-607.
- Rosenfeldt H. M., Amrani Y., Watterson K. R., Murthy K. S., Panettieri R. A. Jr., Spiegel S. (2003). Sphingosine-1-phosphate stimulates contraction of human airway smooth muscle cells. *FASEB J*, 17: 1789-1799.
- Rosenfeldt H. M., Hobson J. P., Milstien S., Spiegel S. (2001). The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility. *Biochem Soc Trans*, 29 (6): 836-839.
- Ross R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362: 801-809.
- Rzucidlo E. M., Martin K. A., Powell R. J. (2007). Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*, 45: 25A-32A.

-
- Saba J. D., Hla T. (2004). Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circ Res*, 94: 724-734.
- Salomone S., Yoshimura S., Reuter U., Foley M., Thomas S. S., Moskowitz M. A., Waeber C. (2003). S1P3 receptors mediate the potent constriction of cerebral arteries by sphingosine-1-phosphate. *Eur J Pharmacol*, 469: 125-134.
- Sanchez T., Estrada-Hernandez T., Paik J. H., Wu M. T., Venkatamaran K., Brinkmann V., Claffey K., Hla T. (2003). Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits VEGF-induced vascular permeability. *J Biol Chem*, 278: 47281-47290.
- Shanahan C. M., Weissberg P. L. (1997). Smooth muscle cell heterogeneity – Patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 333-338.
- Sanna M. G., Liao J., Jo E., Alfonso C., Ahn M.-Y., Peterson M. S., Webb B., Lefebvre S., Chun J., Gray N., Rosen H. (2004). Distinct S1P receptor subtypes S1P₁ and S1P₃ respectively regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem*, 279: 13839-13848.
- Shirao S., Kashiwagi S., Sato M., Miwa S., Nakao F., Kurokawa T., Todoroki-Ikeda N., Mogami K., Mizukami Y., Kuriyama S., Haze K., Suzuki M., Kobayashi S. (2002). Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery. Unimportant role for protein kinase C. *Circ Res*, 91: 112-119.
- Shu X., Wu W., Mosteller R. D., Broek D. (2002). Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*, 22: 7758-7768.
- Siess W. (2002). Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*, 1582: 204-215.
- Siess W., Essler M., Brandl R. (2000). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate: two lipid villains provoking cardiovascular diseases? *IUMMB Life*, 49: 161-171.
- Spiegel S., Milstien S. (2000). Sphingosine-1-phosphate: signalling inside and out. *FEBS Letters*, 476: 55-57.
- Spiegel S., Milstien S. (2002). Sphingosine 1-phosphate, a key cell signalling molecule. *J Biol Chem*, 277: 25851-25854.

-
- Spiegel S., Milstien S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature*, 4: 397-407.
- Steinhausen M. (1993). *Medizinische Physiologie. Lehrbuch*, 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, ISBN 3-437-00745-9.
- Stryer L. (1996). *Biochemie*. 4. Auflage. Spektrum, akad. Verlag. ISBN 3-86025-346-8.
- Sugimoto N., Takuwa N., Okamoto H., Sakurada S., Takuwa Y. (2003). Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the $G_{12/13}$ -Rho and G_i pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol Cell Biol*, 23: 1534-1545.
- Sugiura M., Kono K., Liu H., Shimizugawa T., Minekura H., Spiegel S., Kohama T. (2002). Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J Biol Chem*, 277 (26): 23294-23300.
- Sugiyama A., Aye N. N., Yatomi Y., Ozaki Y., Hashimoto K. (2000a). Effects of sphingosine 1-phosphate, a naturally occurring biologically active Lysophospholipid, on the rat cardiovascular system. *J Clin Invest* 101, 82: 338-342.
- Sugiyama A., Yatomi Y., Ozaki Y., Hashimoto K. (2000b). Sphingosine 1-phosphate induces sinus tachycardia and coronary vasoconstriction in the canine heart. *Cardiovasc Res*, 46: 119-125.
- Takuwa Y., Okamoto H., Takuwa N., Gonda K., Sugimoto N., Sakurada S. (2001). Subtype-specific, differential activities of the EDG family receptors for sphingosine-1-phosphate, a novel lysophospholipid mediator. *Mol Cell Endocrinol*, 177: 3-11.
- Tosaka M., Okajima F., Hashiba Y., Saito N., Nagano T., Watanabe T., Kimura T., Sasaki T. (2001). Sphingosine 1-phosphate contracts canine basilar arteries in vitro and in vivo. *Stroke*, 32: 2913-2919.
- Van Brooklyn J. R., Lee M-J., Menzeleev R., Olivera A., Edsall L., Cuvillier O., Thomas D. M., Coopman P. J. P., Thangada S., Liu C. H., Hla T., Spiegel S. (1998). Dual actions of Sphingosine-1-phosphate: extracellular through the G_i -coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol*, 142 (1): 229-240.
- Van Koppen C. J., Meyer zu Heringdorf D., Alemany R., Jakobs K. H. (2001). Sphingosine kinase-mediated calcium signaling by muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci*, 68: 2535-2540.

-
- Van Koppen C. J., Meyer zu Heringdorf D., Laser K. T., Zhang C., Jakobs K. H., Bünemann M., Pott L. (1996). Activation of a high affinity G_i protein-coupled plasma membrane receptor by sphingosine-1-phosphate. *J Biol Chem*, 271: 2082-2087.
- Van Veldhoven P. P., De Ceuster P., Rozenberg R., Mannaerts G. P., de Hoffmann E. (1994). On the presence of phosphorylated sphingoid bases in rat tissues – a mass-spectrometric approach. *FEBS Lett*, 350: 91-95.
- Van Veldhoven P. P., Mannaerts G. P. (1994). Sphinganine 1-phosphate metabolism in cultured skin fibroblasts: evidence for the existence of a sphingosine phosphatase. *Biochem J*, 299: 597-601.
- Varayound J., Ramos J. G., Joazeiro P. P., Montes G., Munoz de Toro M. M., Luque E. H. (2001). Characterization of fibroblastic cell plasticity in the lamina propria of the rat uterine cervix at term. *Biol Reprod*, 65: 375-383.
- Voet D., Voet J. G. Pratt C. W. (1994). *Lehrbuch der Biochemie*. 1. Auflage. VCH. ISBN 3-527-29249-7.
- Walker L. N., Bowen-Pope D. F., Ross R., Reidy M. A. (1986). Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 7311-7315.
- Wang F., Van Brooklyn J. R., Hobson J. P., Movafagh S., Zukowska-Grojec Z., Milstien S., Spiegel S. (1999). Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a $G(i)$ -coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem*, 274: 35343-35350.
- Watterson K. R., Ratz P. H., Spiegel S. (2005). The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. *Cell Signal*, 17: 289-298.
- Wiksten M., Väänänen A. J., Liebkind R., Liesi P. (2004). Regeneration of adult rat spinal cord is promoted by the soluble KDI Domain of $\gamma 1$ laminin. *Journal of Neuroscience Research*, 78: 403-410.
- Xia P., Wang L., Moretti P. A., Albanese N., Chai F., Pitson S. M., D'Andrea R. J., Gamble J. R., Vadas M. A. (2002). Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor- α signaling. *J Biol Chem*, 277: 7996-8003.
- Xu C-B., Hansen-Schwartz J., Edvinsson L. (2004). Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta Pharmacol Sin*, 25 (7): 849-854.

-
- Xu C-B., Zhang Y., Stenman E., Edvinsson L. (2002). D-erythro-N,N-dimethylsphingosine inhibits bFGF-induced proliferation of cerebral, aortic and coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 164: 237-243.
- Yang L., Yatomi Y., Miura Y., Satoh K., Ozaki Y. (1999). Metabolism and functional effects of Sphingolipids in blood cells. *Br J Haematol.*, 107: 282-293.
- Yang Z., Chen M., Fialkow L. B., Ellett J. D., Wu R., Brinkmann V., Nadler J. L., Lynch K. R. (2003). The immune modulator FYT720 prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice small star, filled. *Clin Immunol*, 107: 30-35.
- Yatomi Y., Igarashi Y., Yang L., Hisano N., Qi R., Asazuma N., Satoh K., Ozaki Y., Kume S. (1997a). Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem*, 121: 969-973.
- Yatomi Y., Ohmori T., Rile G., Kazama F., Okamoto H., Sano T., Satoh K., Kume S., Tigyi G., Igarashi Y., Ozaki Y. (2000). Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood*, 96: 3431-3438.
- Yatomi Y., Ruan F., Hakomori S., Igarashi Y. (1995). Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood*, 86: 193-202.
- Yatomi Y., Welch R. J., Igarashi Y. (1997b). Distribution of sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid, in rat tissues. *FEBS Lett*, 404: 173-174.
- Yoshimoto T., Furuhashi M., Kamiya S., Hisada M., Miyaji H., Magami Y., Yamamoto K., Fujiwara H., Mizuguchi J. (2003). Positive modulation of IL-12 signaling by sphingosine kinase 2 associating with the IL-12 receptor beta1 cytoplasmic region. *J Immunol*, 171: 1352-1359.
- Young K. W., Nahorski S. R. (2002). Sphingosine 1-phosphate: a Ca^{2+} release mediator in the balance. *Cell Calcium*, 32(5-6): 335-341.
- Zanolari B., Friant S., Funato K., Sutterlin C., Stevenson B. J., Riezman H. (2000). Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 19: 2824-2833.
- Zhang H., Buckley N. E., Gibson K., Spiegel S. (1990). Sphingosine stimulates cellular proliferation via a protein kinase C-independent pathway. *J Biol Chem*, 265: 76-81.

-
- Zhang H., Contos J. J., Weiner J. A., Fukushima N., Chun J. (1999). Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene*, 227: 89-99.
- Zhang H., Desai N. N., Olivera A., Seki T., Brooker G., Spiegel S. (1991). Sphingosine-1-phosphate: a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol*, 114: 155-167.
- Zhou H., Murthy K. S., (2004). Distinctive G protein-dependent signalling in smooth muscle by sphingosine 1-phosphate receptors S1P₁ and S1P₂. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 286: 1130-1138.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Müller
Vorname:	Cindy
Geburtsdatum:	04.06.1977
Geburtsort:	Fulda
Anschrift:	Tulpenstrasse 12 63263 Neu-Isenburg
Telefon:	06102 32 28 00
Mobil:	0160 94 18 49 05
Familienstand:	ledig

Schulische und berufliche Ausbildung

1983-1987	Grundschule Uerzell
1987-1996	Ulrich-von-Hutten-Gymnasium, Schlüchtern; Abschluss: Abitur
1996-2006	Humanmedizinstudium an der Justus-Liebig-Universität Gießen
September 1998	Ärztliche Vorprüfung
August 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04-08/2002	Erstes PJ-Tertial in der Abteilung Diagnostische Radiologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen
08-12/2002	Zweites PJ-Tertial in der chirurgischen Abteilung des Ngwelezana Hospital in Empangeni, Südafrika
01-04/2003	Drittes PJ-Tertial in der Abteilung Medizinische Klinik des Kantonsspital Winterthur, Schweiz
Mai 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: gut)
seit Juni 2003	Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus- Liebig-Universität Gießen
seit Feb 2005	wissenschaftliche Angestellte am Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Danksagung

Ermöglicht wurde diese Arbeit durch die Mithilfe und Unterstützung von vielen Menschen, denen ich an dieser Stelle nochmals herzlich danken möchte.

Herrn Prof. Dr. W. Kummer möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die engagierte Unterstützung und die große Geduld bedanken, die er über die gesamte Zeit aufgebracht hat.

Herrn PD Dr. R. Haberberger danke ich für die hervorragende Betreuung, die fachliche Unterstützung und für die immerwährende Hoffnung auf ein erfolgreiches Ende.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie, die mich sehr in meiner Arbeit unterstützt haben. Insbesondere möchte ich mich hier für die praktische Mitarbeit und Hilfe von Frau T. Papadakis und Herrn M. Bodenbenner bedanken. Weiterhin danke ich Frau F. Kindt, Herrn Dr. M. Henrich und Herrn Dr. P. König für viele fachliche und persönliche Gespräche, die mir sehr häufig weitergeholfen haben.

Für die Einarbeitung und Mithilfe beim Layouten von Abbildungen dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei Frau K. Michael bedanken.

Bei Problemen mit Soft- und/oder Hardware konnte ich immer auf die prompte Hilfe von Herrn S. Hill zählen, dafür möchte ich mich hier herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die durch ihre Unterstützung und ihr Verständnis, mir diesen Weg ermöglichte. Besonders möchte ich meinem Bruder Chris danken, der mir vor allem in formalen Fragen sehr weitergeholfen hat, und meiner Schwester Conny, die inzwischen mehr über die SPHK1a weiß, als es ihr BWL-Studium vorsieht.